UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

1952-1953 — N° 371

ROLE DU LABORATOIRE

DANS

L'ÉTUDE DES MALADIES MICROBIENNES A FLORE SÉLECTIONNÉE ET SUBSTITUÉE

(Travail effectué au Laboratoire de Bactériologie
de la 4e Région Militaire, Docteur GRENIER DE CARDENAL.)

THÈSE POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ

Mention « PHARMACIE »

Présentée et soutenue publiquement le Lundi 29 Juin 1953

PAR

Paul-Bernard-Émile-Charles FAULON

PHARMACIEN

Né à Réaup (Lot-et-Garonne), le 24 Janvier 1928

Examinateurs de la Thèse

MM. SIGALAS, professeur	*Président*
GIRARD, professeur	*Juges*
MOUSTARDIER, maître de conférences agrégé	*Juges*
MASQUELIER, maître de conférences agrégé.	*Juges*

BORDEAUX
IMPRIMERIE E. DROUILLARD
3, PLACE DE LA VICTOIRE

1954

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543913_0064

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

1952-1953 — N° 371

ROLE DU LABORATOIRE DANS L'ÉTUDE DES MALADIES MICROBIENNES A FLORE SÉLECTIONNÉE ET SUBSTITUÉE

(Travail effectué au Laboratoire de Bactériologie
de la 4e Région Militaire, Docteur GRENIER DE CARDENAL.)

THÈSE POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ

Mention « PHARMACIE »

Présentée et soutenue publiquement le Lundi 29 Juin 1953

PAR

Paul-Bernard-Émile-Charles FAULON

PHARMACIEN

Né à Réaup (Lot-et-Garonne), le 24 Janvier 1928

Examinateurs de la Thèse :

MM. SIGALAS, professeur ..... *Président*
GIRARD, professeur.....
MOUSTARDIER, maître de conférences agrégé } *Juges*
MASQUELIER, maître de conférences agrégé.

BORDEAUX
IMPRIMERIE E. DROUILLARD
3, PLACE DE LA VICTOIRE

1954

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

DOYENS HONORAIRES : MM. DUPÉRIÉ, CHELLE.
DOYEN : M. PORTMANN. — **ASSESSEUR** : M. SIGALAS.

PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. A. MANDOUL, GUYOT, ANDÉRODIAS, ROCHER, LANDE, DUVERGEY, CARLES, LEURET, PÉRY, LABAT, CHARRIER, DUBREUIL, CRUCHET, PERRENS

PROFESSEURS :

	MM.
Clinique médicale	CREYX, BROUSTET
Clinique chirurgicale	PAPIN, MASSÉ
Clinique d'accouchements	RIVIÈRE
Clinique gynécologique	MAGENDIE
Anatomie pathologique et microscopie clinique	DE GRAILLY
Anatomie	DUFOUR
Anatomie générale et histologie	MAYER
Hygiène et Clinique de la tuberculose	PIÉCHAUD
Médecine légale et médecine du travail	DERVILLÉE
Electroradiologie et clinique d'électricité médicale	REBOUL
Chimie	MESNARD
Matière médicale	GOLSE
Pharmacie	VITTE
Physiologie	FABRE
Clinique médicale des maladies des enfants	FONTAN
Zoologie et parasitologie	SIGALAS

	MM.
Pathologie générale et expérimentale	SARIC
Clinique ophtalmologique	BEAUVIEUX
Clinique chirurgicale infantile et orthopédie	POUYANNE
Clinique médicale et des maladies infectieuses	AUBERTIN
Chimie biologique et médicale	TAYEAU
Physique médicale et pharmaceutique	PIFFAULT
Médecine coloniale et Clinique des maladies exotiques	BONNIN
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques	JOULIA
Clinique des maladies des voies urinaires	DARGET
Clinique des maladies nerveuses et mentales	DELMAS-MARSALET
Clinique d'oto-rhino-laryngologie	PORTMANN
Toxicologie et hygiène appliquée	CASTAGNOU
Clinique odonto-stomatologique	DUBECQ
Botanique et cryptogamie	GIRARD
Thérapeutique	F.-J.TRAISSAC
Hydrologie thérapeutique et climatologie	DUBARRY

PROFESSEUR A TITRE PERSONNEL :

M. BLANQUET (Section Pharmacie)

PROFESSEURS SANS CHAIRE :

MM. MAHON (Obstétrique), PAUTRIZEL (Parasitologie)

MAITRES DE CONFÉRENCES AGRÉGÉS :

	MM.
Physiologie	Mlle ROUGIER
Bactériologie	MOUSTARDIER
Anatomie pathologique	LÉGER
Anatomie	RIGAUD
Pharmacie (1re Section)	R. GOLSE

	MM.
Pharmacie (2e Section)	MASQUELIER, QUILICHINI
Pharmacie (3e Section)	CAZAUX
Biochimie médicale	NEUZIL
Pathologie expérimentale	FAURE

CHARGÉ DES FONCTIONS DE MAITRE DE CONFÉRENCES AGRÉGÉ :

M. STOLL (Histologie)

AGRÉGÉS EN EXERCICE :

	MM.
Médecine générale	BERGOUIGNAN, LENG-LÉVY, MORETTI, LAVIGNOLLE
Chirurgie générale	LAUMONIER, CHAVANNAZ, VILLAR, TINGAUD, DEPAULIS
Obstétrique	CHASTRUSSE, FAUGÈRE

	MM.
Ophtalmologie	BESSIÈRE
Oto-rhino-laryngologie	DESPONS
Dermatologie et syphiligraphie	LE COULANT
Pédiatrie et puériculture	VERGER
Médecine légale et médecine du travail	L'ÉPÉE
Electro-radiologie	LACHAPÈLE
Odonto-stomatologie	BENOIT
Urologie	LANGE

COURS COMPLÉMENTAIRES :

	MM.
Médecine opératoire	LAUMONIER
Accouchements	CHASTRUSSE
Puériculture	VERGER, PÉRY
Législation pharmaceutique	COUSTOU
Anatomie	CABANIE
Cryptogamie	LAUBIE

	MM.
Obstétricie sociale	MAHON
Organographie et physiologie végétale	TEMPÈRE
Chimie biologique analytique	MARQUEVIELLE
Chimie analytique	BABIN
Pathologie chirurgicale	LAUMONIER, VILLAR
Zoologie pharmaceutique	BAILENGER

Le Secrétaire principal de la Faculté : ROUGERIE.

Par délibération du 5 août 1879, la Faculté a arrêté que les opinions émises dans les Thèses qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle entend ne leur donner ni approbation ni improbation.

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

A MON PÈRE ET A MA MÈRE

A mes parents, qui ont consacré leur vie à réaliser le bonheur de leur fils, je suis heureux de dédier ce travail, faible témoignage de mon profond amour.

A MA FIANCÉE

A MA FAMILLE

A MES AMIS

A NOTRE MAITRE

LE MÉDECIN COMMANDANT GRENIER DE CARDENAL

ANCIEN ÉLÈVE DE L'INSTITUT PASTEUR

CHEF DU LABORATOIRE DE BACTÉRIOLOGIE

CHEF DE SERVICE DES MALADIES INFECTIEUSES

A L'HÔPITAL MILITAIRE ROBERT-PICQUÉ

Vous nous avez fait le grand honneur de nous confier cette thèse et de participer à son élaboration.
Nous vous prions de bien vouloir trouver ici le témoignage de notre très vive gratitude et de notre profond respect.

A NOTRE JURY DE THÈSE

MONSIEUR J. MASQUELIER

MAÎTRE DE CONFÉRENCES AGRÉGÉ DE PHARMACIE

DOCTEUR ÈS SCIENCES

MONSIEUR LE DOCTEUR G. MOUSTARDIER

MAÎTRE DE CONFÉRENCES AGRÉGÉ DE BACTÉRIOLOGIE

MÉDECIN DES HÔPITAUX COLONIAUX

CHEVALIER DE LA LÉGION D'HONNEUR

MÉDAILLE DE LA RÉSISTANCE FRANÇAISE

MÉDAILLE COLONIALE

MÉDAILLE DES ÉPIDÉMIES

OFFICIER D'ACADÉMIE

MONSIEUR LE PROFESSEUR R. GIRARD

PROFESSEUR DE BOTANIQUE ET DE CRYPTOGAMIE

DIRECTEUR DE L'INSTITUT BOTANIQUE DE TALENCE

CHEVALIER DE LA LÉGION D'HONNEUR

OFFICIER DE L'INSTRUCTION PUBLIQUE

OFFICIER DU MÉRITE AGRICOLE

OFFICIER DU MÉRITE TOURISTIQUE

A NOTRE PRÉSIDENT DE THÈSE

MONSIEUR LE PROFESSEUR R. SIGALAS

PROFESSEUR DE ZOOLOGIE ET PARASITOLOGIE

DIRECTEUR HONORAIRE DE LA STATION BIOLOGIQUE D'ARCACHON

OFFICIER DE LA LÉGION D'HONNEUR

CROIX DE GUERRE

OFFICIER DE L'INSTRUCTION PUBLIQUE

En reconnaissance de la bienveillance qu'il nous a toujours témoignée.

ROLE DU LABORATOIRE
DANS L'ÉTUDE DES MALADIES MICROBIENNES
A FLORE SÉLECTIONNÉE ET SUBSTITUÉE

INTRODUCTION

Le traitement des maladies microbiennes a posé de tout temps un des problèmes les plus sérieux qui ait été soumis à l'attention des chercheurs.

Si, dans le passé, les simples avaient donné certains résultats, la sérothérapie consécutive aux travaux de Pasteur, la chimiothérapie et la sulfamidothérapie après les découvertes d'Erlich et de Domacgk avaient fait naître de grands espoirs, de nombreux échecs ont amenuisé cet enthousiasme.

Les résultats obtenus par la mycothérapie, à la suite de la découverte de la pénicilline par Flemming, ont fait croire à une véritable révolution de la thérapeutique. De nombreuses affections microbiennes, jusqu'ici difficilement curables, ont dû s'incliner devant cette arme. Cependant, elle peut parfois être défaillante, et il peut se produire des échecs dont nous allons rechercher les causes.

Ces causes peuvent être de deux ordres :

En premier lieu la notion de résistance acquise peut expliquer les récidives et le passage à la chronicité. C'est ainsi que des germes sensibles à un antibiotique lui restent indifférents au cours d'une affection ultérieure : ils sont devenus résistants.

Ceci nous permettra de définir ce que nous entendons par :

— Sensibilité,
— Résistance,
— Résistance acquise

d'un germe à un antibiotique.

— Un germe est dit sensible à un antibiotique quand, soumis à son action, il est inhibé dans son développement (effet bactériostatique), ou détruit (effet bactéricide).

— Un germe est dit résistant quand il reste indifférent à l'action de l'antibiotique.

— Cette résistance est dite acquise quand, au cours d'une première affection, un germe est sensible à un antibiotique et qu'il reste indifférent à ce même antibiotique administré au cours d'une nouvelle poussée évolutive de la maladie.

En second lieu, dans une affection microbienne, si la plasticité et l'adaptation des germes ne font aucun doute, nous voulons mettre en évidence un autre facteur de chronicité qui n'exclut en rien les phénomènes de résistance acquise. Au cours d'une première atteinte par un germe donné, traité par un antibiotique actif, diverses éventualités peuvent se produire :

— L'élimination définitive, d'une part, du germe pathogène sensible à l'antibiotique administré.

— D'autre part, la sélection d'une flore nouvelle, d'emblée et naturellement résistante à l'antibiotique utilisé, succédant à la flore primitivement responsable du tableau clinique constaté.

— Enfin, l'installation définitive de cette flore nouvelle, au niveau des lésions organiques affectant un sujet dont l'état physiologique momentané est déficient. D'où la notion de sélection et de substitution de germes sur un terrain prédisposé.

Dans certains cas, l'infection secondaire consécutive à

un traitement mycothérapique, peut être de nature fongique.

Ceci nous conduira, tout d'abord, à l'étude :

— D'une part, du mode d'action des antibiotiques sur les germes et de l'acquisition de la résistance *in vitro* et *in vivo*.

— D'autre part, des phénomènes de substitution de germes et des modifications de la flore microbienne sous l'influence des antibiotiques.

Nous exposerons ensuite notre méthode d'identification de germes aérobies de contamination courante et la détermination de leur sensibilité aux antibiotiques.

CHAPITRE PREMIER

PHÉNOMÈNES D'ACQUISITION DE RÉSISTANCE DES GERMES AUX ANTIBIOTIQUES

L'acquisition de la résistance aux antibiotiques par certains germes présente un double intérêt :

— D'une part, pour la conduite du traitement.

— D'autre part, pour l'étude de la génétique et de la physiologie bactériennes.

Différentes hypothèses ont essayé d'expliquer ce phénomène, mais une certaine confusion règne à l'heure actuelle. C'est pourquoi ce sont les multiples aspects de la résistance, tant *in vitro* qu'*in vivo*, que nous voudrions envisager, en montrant à la fois les liens et les divergences qui existent entre eux.

Toutefois, l'étude de l'acquisition de la résistance d'un germe à un agent bactériostatique ou bactéricide suppose, en principe, la connaissance du mode d'action admis, du moins actuellement, de cet agent thérapeutique.

C'est l'étude de ce mode d'action que nous allons envisager en premier lieu, avant de passer à l'étude de la résistance *in vitro* et *in vivo*.

L'étude mycologique et la recherche du pouvoir antibiotique de plusieurs millions d'échantillons de terre,

prélevés dans toutes les parties du globe, ont permis de fournir à la thérapeutique un certain nombre d'agents mycothérapiques.

La pénicilline extraite de		*Penicillium notatum.*
La streptomycine	—	*Streptomyces griseus.*
La tyrothricine	—	*Bacillus brevis.*
La streptothricine	—	*Streptomyces lavendulae.*
La bacitracine	—	*Bacillus subtilis.*
La polymixine	—	*Bacillus polymixinus.*
La chloromycétine	—	*Streptomyces venezuelae.*
L'auréomycine	—	*Streptomyces aureofaciens.*
La terramycine	—	*Streptomyces rimosus.*

A l'heure actuelle, cinq d'entre eux occupent une large place dans la thérapeutique et sont couramment utilisés. Ce sont :

La pénicilline,
La streptomycine,
La chloromycétine,
L'auréomycine,
La terramycine.

Il semble admis, à l'heure actuelle, que le mode d'action des antibiotiques semble se rapprocher beaucoup de celui des agents antibactériens de synthèse. Un rapprochement très net a pu être fait pour certains antibiotiques, d'après Hotchkiss et Loomis [22 et 30]. Rien ne permet d'établir qu'il existe de distinction nette, si ce n'est qu'il s'agit de substances naturelles dont le pouvoir antibactérien se manifeste pour des doses extrêmement faibles. Leur toxicité pour les animaux de laboratoire est souvent inférieure à celle des drogues synthétiques.

Parmi les substances de synthèse, les quinones semblent exercer leur pouvoir bactériostatique par blocage de la fonction sulfhydrilée des coenzymes soufrés.

Woods, Selbie, Rubbo et Gyllipsie, Kuhn [50] ont montré qu'il existe un antagonisme, par isostérie, entre

l'acide para-amino-benzoïque et les sulfamides. Leur structure est comparable sous plusieurs aspects. Cette compétition suggère, au sujet de la sulfamido-résistance, une explication satisfaisante, prouvée par une surproduction de ce métabolite essentiel lors de l'apparition de la résistance.

En revanche, le mode d'action des antibiotiques demeure très mystérieux et, si l'on a recueilli à son sujet des données d'un incontestable intérêt, on ignore encore si les perturbations qui ont été décelées correspondent à l'action primordiale de l'antibiotique sur la bactérie, ou n'en sont qu'une conséquence indirecte.

Les chercheurs ont été guidés dans cette étude par trois hypothèses. Elles sont basées sur ce que l'on savait du mode d'action de certains poisons cellulaires et de quelques substances antibactériennes de synthèse :

1° C'est ainsi que l'action des antibiotiques sur les bactéries pourrait être la conséquence d'une action chimique ou purement physique de l'antibiotique sur une certaine structure cellulaire dont le maintien serait indispensable à la vie.

2° Ou encore, l'antibiotique empêcherait l'intervention d'un métabolite dans une réaction chimique importante pour la vie ou pour la repróduction de la cellule. Ceci semblerait être dû soit à la combinaison directe de l'antibiotique avec le métabolite, soit à la compétition stéréochimique qui pourrait exister entre l'antibiotique considéré et le métabolite.

3° Ou enfin, le pouvoir antibactérien serait la conséquence de l'inhibition d'un système enzymatique. Cette inhibition pourrait résulter :

— Soit d'une combinaison de l'antibiotique avec l'enzyme ou le coenzyme, ou avec un quelconque effecteur important du système enzymatique.

— Soit de la compétition entre l'un des constituants du système enzymatique et l'antibiotique.

I. — MODE D'ACTION DE LA PÉNICILLINE

Dans l'arsenal mycothérapique, la pénicilline occupe une place des plus prépondérantes. Premier antibiotique découvert, il s'avère le moins toxique, le plus maniable, le plus couramment utilisé. Aussi, retiendra-t-il davantage notre attention.

A. — Nécessité de multiplication des germes.

D'après Machebœuf et Gros [33], une certaine multiplication microbienne en présence de pénicilline est indispensable pour qu'un germe soit sensible à cet antibiotique.

En effet, si la cellule bactérienne est au repos, la pénicilline, même à concentration élevée, ne provoque ni lyse, ni modification physico-chimique. C'est seulement lorsque les bactéries se trouvent dans des conditions convenables pour leur prolifération que cet antibiotique peut provoquer la lyse, ou inhiber des réactions enzymatiques.

Pour expliquer ce fait, trois hypothèses, entre lesquelles il est difficile de choisir actuellement, ont été émises :

1° L'antibiotique inhiberait, ou activerait, une réaction qui serait indispensable pour que la reproduction bactérienne évolue jusqu'à son terme normal. Mais cette réaction ne serait pas indispensable à la survie des bactéries lorsqu'elles ne se multiplient pas.

L'influence considérable de la pénicilline sur le métabolisme des acides ribonucléiques serait en faveur de cette hypothèse.

2° Ou bien, la prolifération des germes serait nécessaire pour que l'antibiotique puisse pénétrer dans la cellule microbienne ou se fixer sur elle, et atteindre ainsi le système enzymatique ou le métabolite sensibles avec lesquels il doit réagir ou entrer en compétition.

C'est ainsi que les expériences de Maas et Johnson [32]

et celles de Rowley, Cooper, Roberts et Smith [42] ont permis de prouver la nécessité de croissance des bactéries pour que la pénicilline puisse agir.

D'autres faits sont en faveur de cette hypothèse :

— Les microbes doués d'une résistance nouvelle à l'antibiotique ne fixent que très peu de pénicilline même pendant leur croissance.

— Quand on rencontre, au sein d'une espèce microbienne sensible, des individus présentant une résistance normale à la pénicilline, on constate également que ces germes fixent très peu d'antibiotique.

3° Ou, enfin, la pénicilline subirait des transformations sous l'action des bactéries en croissance; le ou les produits résultant de l'action bactérienne constitueraient la véritable substance douée d'affinité pour le système enzymatique sensible.

Certaines expériences de Pollock [41] semblent apporter des arguments en faveur de cette hypothèse.

Mais la nécessité de la prolifération pour que l'antibiotique agisse ne suffit pas pour interpréter son mode d'action. Les recherches tendant à localiser l'action de l'antibiotique à une réaction métabolique conservent le plus grand intérêt.

B. — Action de la Pénicilline sur les différents métabolismes.

1° *Métabolisme glucidique.* — D'après les travaux de Schuler [45], de Hirsch et Dosdogru [21], de Kramptiz et Werkmann [26], de Gros et Machebœuf [18], la pénicilline n'a pas d'action inhibitrice sur l'utilisation du glucose sur les bactéries non proliférantes et ne provoque aucune modification d'activité de tous les systèmes enzymatiques de la chaîne d'oxydation.

Les modifications essentielles semblent résider dans la suppression ou l'inhibition de certains processus interve-

nant dans le métabolisme des protides et des acides nucléiques.

2° *Métabolisme protidique.* — Les modifications relatives à ce métabolisme consistent plus spécialement dans la disparition chez les germes du pouvoir de concentrer spécifiquement l'acide glutamique présent dans le milieu ambiant.

En 1946, Gale et Taylor [12] avaient reconnu que la pénicilline empêchait l'assimilation de l'acide glutamique par les staphylocoques sensibles. Cet acide étant indispensable à la synthèse des protéines, les bactéries cesseraient de proliférer lorsqu'elles auraient épuisé leurs réserves en cet amino-acide. Les bactéries Gram négatif qui peuvent réaliser la synthèse de l'acide glutamique, ne possèdent pas de système enzymatique en assurant l'assimilation. On conçoit donc que ces bactéries soient à peu près insensibles à l'action de la pénicilline. C'est par un mécanisme analogue qu'apparaîtrait la pénicillino-résistance au sein d'une population sensible de microbes à Gram positif. Les recherches de Gale montrent que les staphylocoques pénicillino-résistants présentent une activité assimilatrice très faible vis-à-vis de l'acide glutamique; et, pour des degrés très élevés de résistance, les staphylocoques ont perdu toute capacité d'assimilation de cet acide.

Gale et Rodwell [13] ont montré que des germes devenus résistants se développent en milieu synthétique privé de cet amino-acide et ne contenant, comme source d'azote, que de l'ammoniaque et de la thiamine.

La théorie de Gale trouve un argument favorable dans le fait que l'inhibition de l'assimilation de l'acide glutamique apparaît pour des faibles concentrations d'antibiotiques, de l'ordre des concentrations bactériostatiques.

Mais elle se heurte, toutefois, à certaines objections :

Hotchkiss [23] note que pour certaines souches de sta-

phylocoques sensibles, il n'y a pas d'inhibition importante de l'assimilation de l'acide glutamique.

Grelet [17], Hunter et Baker [24] ont constaté que certaines souches sensibles de *Bacillus subtilis* peuvent se développer parfaitement sur milieu synthétique sans amino-acide.

D'après ces faits, Machebœuf et Gros [34] accordent une importance certaine au blocage de l'assimilation de l'acide glutamique, mais ce blocage ne semble pas constituer le mode d'action primaire de la pénicilline. La prépondérance des modifications semblerait appartenir au métabolisme ribonucléique.

3° *Métabolisme ribonucléique.* — Dans l'action batériostatique de la pénicilline, les modifications du métabolisme de l'acide glutamique ne seraient qu'une conséquence, tandis que les modifications primordiales concerneraient le métabolisme ribonucléique.

Les modifications concernent l'inhibition du catabolisme de certains mononucléotides et nucléosides. Il semble que la phase du métabolisme qui est intéressée soit celle qui se situe au moment du clivage des liaisons osidiques.

Kramptiz et Werkmann [27], aux Etats-Unis, Machebœuf et Gros [35, 36], en France, montrent que la pénicilline, à dose suffisante, ralentit considérablement le catabolisme des polynucléotides et des mononucléotides pour les bactéries à l'état proliférant. Ces auteurs pensent que l'action fondamentale porte sur des systèmes enzymatiques intervenant dans le catabolisme ribonucléique au stade des nucléosides. Comme la pénicilline n'agit plus sur l'oxydation du ribose lorsqu'il est libéré, deux hypothèses seulement sont à envisager :

— L'antibiotique agit sur le clivage entre la base et le ribose.

— Ou bien sur un système enzymatique intervenant dans l'oxydation ou la transformation directe du ribose

sous la forme de nucléoside. Les résultats des recherches de Machebœuf et Gros laissent supposer que des bactéries traitées par de faibles doses de pénicilline pendant leur prolifération, doivent accumuler en leur sein des nucléosides ou des nucléotides qu'elles ne peuvent plus cataboliser.

Effectivement, divers auteurs, tels que Mitchell [37, 38], en Angleterre, Ebel [9], en France, puis Park et Johnson [40], aux Etats-Unis, ont observé qu'aussitôt après addition de pénicilline à des cultures en phase exponentielle de prolifération, les cellules s'enrichissent considérablement en mononucléotides puriques et pyrimidiques et en nucléosides.

Park et Johnson ont pu déceler un composé nucléotique, inconnu jusqu'ici, dans la fraction nucléotidique qui s'accumule dans les bactéries traitées par la pénicilline.

La synthèse de l'acide ribonucléique, d'après les travaux de Vendrely [48], Gale [14] et Mitchell [38], semble être inhibée par la pénicilline puisque les bactéries traitées par cet antibiotique semblent s'appauvrir régulièrement en cet élément, par rapport aux bactéries témoins au même stade de culture.

Gale [15], d'après de très récentes expériences, pense que la pénicilline inhibe certains systèmes assurant l'incorporation des purines et des pyrimidines dans l'acide ribonucléique; ses résultats concordent bien avec ceux obtenus par Gros et Machebœuf.

D'après ce que nous venons de voir, et malgré l'évolution constante du problème, l'un des points principaux du mode d'action de la pénicilline sur les germes sensibles paraît bien être le fait de troubler un des systèmes enzymatiques qui régit une réaction intervenant au niveau du métabolisme des ribonucléosides. Le trouble apporté à ce système retentirait sur d'autres processus métaboliques où entrent en jeu des composés nucléosidiques ou leurs dérivés.

II. — MODE D'ACTION DE LA STREPTOMYCINE.

La streptomycine semble porter son action sur la respiration des bactéries.

Werner [49] montre que l'antibiotique agit sur la surface des bactéries et qu'il modifie les perméabilités de la membrane.

Linz [28-29] pense que cet antibiotique se fixe sur les bactéries, puis pénètre par une action physique. Il agirait ensuite chimiquement sur les constituants protoplasmiques. Les nucléoprotéides d'origine bactérienne, à base soit d'acide ribonucléique, soit d'acide ribodesoxynucléique sont précipités.

Gros, Machebœuf, Ryback, Lacaille [19] ont montré que le pouvoir agglutinant de la streptomycine à l'égard de nombreuses bactéries s'explique par la combinaison entre l'antibiotique et les matériaux ribonucléiques de la surface du germe. Il n'existe pas cependant de parallélisme entre l'agglutinabilité des microbes par la streptomycine et leur sensibilité à l'antibiotique.

Actuellement, on attache plus d'intérêt aux données expliquant le mode d'action de la streptomycine par l'inhibition de diverses réactions enzymatiques. C'est le cas de l'inhibition des diamino-oxydases. Geiger, Umbreit et Tonhazy [16] mettent en évidence, chez le colibacille, la réaction de condensation oxalacétate-pyruvate. Le métabolisme des germes devenus résistants comporterait un processus intermédiaire.

III. — MODE D'ACTION DE LA CHLOROMYCÉTINE.

D'après Smith, Worrel, Swanson [43], le pouvoir inhibiteur de la chloromycétine sur le métabolisme normal des bactéries pathogènes est en rapport avec son action inhibitrice sur les estérases bactériennes intervenant dans

l'hydrolyse et la synthèse des esters d'acides gras. L'action antidiastasique de la chloromycétine sur le métabolisme normal des bactéries est parfaite sur l'estérase bactérienne. Il semble que l'antibiotique soit capable d'inhiber l'activité estérasique de la cellule, comme celle des microbes, mais il existerait au niveau de la membrane cellulaire une barrière empêchant la réaction estérase-chloromycétine à l'intérieur de la cellule.

Selon Smith et Worrel [44], certains germes résistent à la chloromycétine en dégradant l'antibiotique qui perd son pouvoir bactériostatique. Cette dégradation peut se produire par hydrolyse de la liaison amide, par réduction du groupement nitré, par oxydation de la fonction alcool secondaire, ou par rupture entre le premier et le deuxième carbone de la partie propane-diol de la molécule.

La chloromycétine, selon Truhaut, Lambin et Boyer [47], agirait sur le bacille typhique en interférant avec l'utilisation du tryptophane. En milieu synthétique, la concentration d'antibiotique nécessaire à empêcher la croissance de ce germe est fonction de la concentration de tryptophane; la phénylalanine serait également antagoniste.

IV. — MODE D'ACTION DE L'AURÉOMYCINE.

Loomis [30] montre que l'auréomycine diminue la phosphorylation aérobie sans inhiber la respiration. Son action ressemble ainsi à celle des phénols substitués et à celle de la gramicidine.

V. — MODE D'ACTION DES COLICINES.

La perte d'un récepteur microbien spécifiquement approprié à l'antibiotique a pu expliquer, dans des cas particuliers, l'apparition de la résistance. Gratia a découvert, en 1925, un antibiotique d'origine colibacillaire actif sur diverses variétés de colibacilles et sur le bacille de Shiga.

Désigné dans la littérature sous le nom de colicine V, son étude a été reprise depuis quelques années.

Da Costa Cruz avait établi que les immunsérums, spécifiquement actifs sur les bactéries sensibles à un phage les protègent contre ce phage.

Guidé par cette découverte, Paul Bordet [2] a reconnu que les bactéries sensibles à l'antibiotique colibacillaire en sont protégées par le sérum antibactérien correspondant.

Cette analogie suggère que la sensibilité de la bactérie à cet antibiotique a pour condition la présence chez la bactérie d'un récepteur approprié, lequel est « bloqué » sous l'action du sérum antibactérien.

Paul Bordet et Beumer [3 et 4] ont pu effectivement extraire ce récepteur des bactéries sensibles. Toujours présent chez celle-ci, et doué du pouvoir de neutraliser l'activité de l'antibiotique dont il sature les affinités pour la bactérie, ce récepteur fait régulièrement défaut chez les individus devenus résistants.

La spécificité de ce récepteur est très étroite.

Le spectre d'activité de ce phage se superpose exactement à celui de la colicine, sans qu'il y ait cependant résistance croisée entre le phage et l'antibiotique. Or, corrélativement, Paul Bordet a montré que les germes résistants au phage, mais non à cet antibiotique, sont privés du récepteur approprié au phage, mais conservent celui qui correspond à la colicine, et inversement.

ACQUISITION DE LA RÉSISTANCE « IN VITRO »

I. — MODE D'APPARITION DE LA RÉSISTANCE.

L'étude de l'action des antibiotiques sur les germes montre qu'il existe deux grands types de résistance.

— L'une que l'on pourrait qualifier de *résistance naturelle* est un caractère de l'espèce, voire d'un groupe très important. Elle concerne toutes les espèces bactériennes dont la croissance n'est pas influencée par l'antibiotique envisagé.

— L'autre type de résistance caractérise certains individus au sein d'une espèce microbienne qui, dans l'ensemble, est sensible à l'antibiotique. C'est le cas d'une souche de staphylocoques résistants à la pénicilline.

Il est possible d'obtenir des souches résistantes à partir d'éléments sensibles par passage en milieu liquide, ou mieux par isolement sur milieux solides contenant de l'antibiotique. Ainsi, si l'on ensemence massivement une série de boîtes de Pétri contenant une gamme sériée d'un antibiotique, on voit qu'au-dessous d'une certaine concentration, la croissance est analogue à celle de la boîte témoin. Au-dessous, on verra apparaître un petit nombre de colonies qui, repiquées, se montreront plus résistantes que la souche primitive.

Le plus souvent, c'est au second type de résistance que l'on fait allusion implicitement lorsqu'on parle de résistance à un antibiotique; mais les deux types décrits posent des problèmes biochimiques d'égale importance.

Toutefois, si le type de résistance « naturelle » semble s'expliquer assez clairement par une spécificité morphologique et biochimique de l'espèce, caractère naturel du groupe bactérien envisagé, en ce qui concerne les phénomènes d'acquisition de résistance, plusieurs théories très différentes s'affrontent.

D'après la *théorie génétique ou mutationiste*, la résistance est la conséquence d'une mutation au sein d'une population sensible, mutation dont la fréquence (1×10^{-8}) est très petite, et qui ne nécessiterait nullement un contact quelconque avec l'antibiotique. Celui-ci ne ferait que sélectionner les mutants au sein d'une population sensible.

Selon la *théorie physiologique ou adaptationiste*, au contraire, l'antibiotique provoque des modifications chez les cellules bactériennes sensibles en voie de croissance, rendant certaines d'entre elles résistantes à son action bactériostatique. On assisterait donc à une transformation biologique induite par l'antibiotique.

A. — Etude de la théorie mutationiste.

La théorie mutationiste forme actuellement un tout solide, basé sur un certain nombre d'expériences classiques dont les résultats plaident en faveur de cette hypothèse (Cavalli [6]).

Il est de règle qu'une espèce de bactéries pathogènes puisse se présenter sous de multiples variantes, différant les unes des autres par le degré de leur virulence à l'égard des divers hôtes possibles et même par la nature des symptômes et des lésions provoquées chez ces hôtes.

De telles variantes peuvent se rencontrer dans la nature; mais on parvient fréquemment à provoquer expérimentalement leur apparition quand on impose au microbe des habitats ou des milieux auxquels ils ne sont pas habitués, en recourant à des passages multiples par des espèces non spontanément sensibles, ou sur des milieux défavora-

bles au développement. Encore que la multiplication des bactéries se fasse sans intervention d'aucune sexualité, le saut d'une variante à une autre peut, faute d'un terme meilleur, être qualifié de mutation; par analogie avec les mutations au sens strict des généticiens qui représentent pour les êtres supérieurs une conséquence exceptionnelle du phénomène sexuel. En effet, dans les deux cas, la chaîne des reproductions conformes se trouve interrompue à un certain instant, par suite de l'apparition de descendants aux propriétés nouvelles. Ces propriétés se conservent fidèlement à travers les générations successives, jusqu'au moment où la capacité de variation vient à s'éveiller une fois de plus. On peut penser que le milieu insolite, en créant des conditions de vie absolument nouvelles, excite la capacité de mutation des microbes. Mais, dès qu'une mutation s'est produite et que, de ce fait, la forme primitive se trouve en mélange avec une ou plusieurs variantes, une action sélective du milieu en cause peut s'exercer pour favoriser celle d'entre toutes les formes présentes qui se montre la plus apte à se multiplier dans les conditions chimiques précises offertes par ce milieu particulier. Ainsi se réaliserait l'adaptation d'un microbe à un nouveau médicament bactériostatique.

La répartition des germes résistants, obtenus à partir de cultures diverses et d'une même culture d'un germe peu sensible, a été étudiée dans le test de fluctuation de Luria et Delbruck. Ce test a été établi sur des bases purement mathématiques par Lea et Coulson, et complété par le test de redistribution.

L'étude statistique des résultats de ce test montre que l'apparition des résistants n'a pu se produire qu'avant l'apparition de l'antibiotique. Mais, souvent, le degré de résistance atteint correspond assez exactement à la concentration d'antibiotique qui l'a fait apparaître. On a, dans ce cas, l'impression que l'effort d'adaptation réalisé par le germe est strictement proportionné à ses besoins

actuels, sans les dépasser; ce qui s'explique mal par la simple sélection d'individus résistants apparus au hasard. La théorie mutationiste peut cependant expliquer de tels faits, en admettant que les possibilités de variation, quant au degré de résistance, puissent ne revêtir qu'une faible amplitude. On sait, effectivement, que l'accoutumance ne se réalise souvent qu'à la condition de faire passer un germe par des milieux successifs, dont l'enrichissement en antibiotique est progressif et soigneusement ménagé. Au surplus, nous devons rappeler l'augmentation de la résistance à l'égard de la streptomycine, qui procède souvent par bonds souvent énormes et sans rapport avec la concentration d'antibiotique mise en œuvre. D'emblée, les germes qui se développent peuvent être en mesure de supporter une concentration de streptomycine mille fois supérieure à celle qui a provoqué leur apparition.

De telles constatations ont singulièrement renforcé la thèse mutationiste, et Demerec [8], après avoir appliqué le test de fluctuation à la pénicilline et à la streptomycine, en devient l'un des principaux protagonistes.

D'autres faits confirment ces démonstrations. Ainsi, English et Mac Coy [11], en sélectionnant un mutant de staphylocoque capable de faire la synthèse de la biotine, devenu résistant à la streptomycine, ont observé qu'il poussait de façon prospère dans un milieu semi-synthétique ne permettant qu'une culture très maigre des germes sensibles primitifs. Si la souche sensible est ensemencée dans un grand nombre de tubes de ce milieu pauvre, de temps à autre un tube sur 121, la culture est aussi prospère que si elle avait été ensemencée de germes résistants. Bien que n'ayant jamais été en contact avec l'antibiotique, la culture ainsi obtenue résiste à plus de 1.000 µg de streptomycine par centimètre cube. La sélection des germes résistants n'a pas nécessité, dans ce cas, l'intervention de l'antibiotique.

Lederberg, par une technique de reports, a réussi à

isoler des résistants sans faire intervenir la streptomycine au cours des manipulations de la souche primitive.

Ces expériences très complexes montrent de façon certaine l'existence de mutants indépendants de l'antibiotique. Cependant, la théorie de mutation indépendante de l'antibiotique n'est pas universellement admise. De nombreux auteurs (Abraham, Ericksen, Vesterdal, Linz, Haudduroy, Barer, Gibson, Eagle, Sevag) ont apporté des faits de valeur souvent inégale qui tendent tous à faire apparaître un certain degré d'induction ou d'adaptation.

B. — Etude de la théorie adaptationiste.

Les « adaptationistes » invoquent le fait qu'une culture, devenue résistante à un antibiotique donné, acquiert, avec la même facilité que la souche dont elle provient, la résistance spécifique à l'égard d'un autre antibiotique. Selon eux, si la première adaptation avait comporté une variation génétique, on ne comprendrait guère qu'elle ne retentit aucunement sur l'aptitude à réaliser la seconde. Cet argument serait peu pertinent car quelle que soit la thèse à laquelle on se rallie, on doit bien admettre que, en s'adaptant une première fois, la souche a subi par rapport à la culture mère sensible, une modification héréditaire.

Un autre argument invoqué repose sur le fait que le degré de résistance atteint correspond souvent assez exactement à la concentration d'antibiotique qui l'a fait apparaître. Mais une telle observation est également expliquée par la théorie mutationiste, comme nous l'avons vu plus haut.

Il semble que l'on puisse concevoir l'existence d'une adaptation active individuelle qui serait héréditaire, sans prendre position quant au problème acquis des caractères supérieurs. Ce n'est pas enfreindre la vraisemblance que d'imaginer qu'un être unicellulaire qui dérive de la simple

scission de la cellule souche puisse hériter de celle-ci des caractères même acquis. Cette question demeure toujours discutée et l'on peut s'étonner, les ressources de la vie étant si multiples, que les deux explications envisagées soient habituellement considérées comme exclusives l'une de l'autre. Rien n'empêcherait d'admettre, semble-t-il, si les faits le suggèrent, que l'accoutumance puisse résulter à la fois de l'apparition de mutants spontanés, fait bien démontré, et de l'adaptation active du germe.

Klein [25] a essayé de mettre en évidence le rôle du hasard. Il ensemence d'un même nombre de germes des centaines de tubes contenant un même milieu à teneur élevée en streptomycine. Il constate que le développement ne se fait que dans quelques tubes seulement. Mais une telle observation peut amener certaines réserves, expliquées par la théorie mutationiste actuellement admise.

Qu'elle soit de caractère induit ou spontané, la résistance aux antibiotiques peut s'expliquer sur des bases biochimiques apparemment simples, comme le montrent Machebœuf et Gros.

1° Les bactéries résistantes différeraient des bactéries sensibles de même espèce par l'absence du système enzymatique qui, chez ces dernières, constitue le point central d'action de l'antibiotique. Il en résulterait chez les résistants une « déviation métabolique » telle que leur métabolisme général et, par là, leur multiplication, est insensible à l'antibiotique.

2° Les résistants posséderaient des systèmes enzymatiques de même activité que les sensibles, mais ces systèmes échapperaient à l'influence de l'antibiotique pour des raisons d'ordre chimique.

3° La résistance bactérienne proviendrait d'une plus ou moins grande perméabilité du germe à l'antibiotique.

4° Dans certains cas, la résistance reposerait sur la sécrétion d'un enzyme détruisant l'antibiotique ou d'une substance entrant en compétition avec lui. Un assez grand

nombre de souches, appartenant à des espèces généralement résistantes à la pénicilline, sécrètent en effet de la pénicillinase qui transforme la pénicilline en acide pénicilloïque inactif. Mais cette remarquable observation, due à Abraham et Chain, ne peut constituer la principale base d'interprétation de la résistance, car de nombreuses souches hautement pénicillino-résistantes ne sécrètent pas de pénicillinase.

II. — CARACTÈRES DE LA RÉSISTANCE *IN VITRO*.

Les résistants sont rares.

La résistance est en général irréversible. Une souche constituée à partir d'un résistant est stable et conserve son titre pendant un grand nombre de repiquages sans antibiotique. Ceci est surtout vrai pour les résistants élevés à la streptomycine. Il y a en revanche un retour très net vers la sensibilité chez les staphylocoques pénicillino-résistants obtenus *in vitro* et chez la plupart des résistants à l'auréomycine, au chloramphénicol et à la terramycine.

La résistance est un caractère spécifique. Il n'existe pas de liaison constante entre la résistance à un antibiotique et un caractère morphologique, biochimique ou immunologique du germe. Cependant, de nombreuses modifications occasionnelles ont été signalées, par exemple les staphylocoques pénicillino-résistants obtenus *in vitro* à partir de souches sensibles non productrices de pénicillinase sont modifiés dans tous leurs caractères biochimiques et même dans leur virulence.

ACQUISITION DE LA RÉSISTANCE « EN CLINIQUE »

I. — RÉSISTANCE ACQUISE AUX DIFFÉRENTS ANTIBIOTIQUES.

L'apparition de la résistance *in vitro* trouve son homologue en clinique.

Ainsi, chez un malade, on isole avant traitement une souche sensible à un antibiotique; après échec thérapeutique, on trouve une souche résistante identique à la première. Ces cas sont difficiles à observer car les malades ne sont pas toujours infectés par une souche unique, d'un type uniforme. De plus, on ne peut toujours affirmer qu'il n'y a pas eu réinfection par une souche analogue. La fréquence d'apparition de ce phénomène varie considérablement suivant les antibiotiques et suivant les germes.

A. — Résistance acquise a la pénicilline.

Les staphylocoques résistants isolés en clinique appartiennent tous au type des staphylocoques producteurs de pénicillinase. Or, les staphylocoques résistants obtenus *in vitro* ne produisent jamais cet enzyme et sont profondément modifiés dans beaucoup de leurs caractères. En clinique, un staphylocoque ne produisant pas de pénicillinase ne peut devenir résistant; mais l'acquisition de la résistance est due à la sélection de souches qui possèdent naturellement cette propriété.

La résistance acquise des streptocoques, méningocoques,

pneumocoques est assez rare. Quelques cas ont été signalés avec des germes particuliers, mais le phénomène de résistance acquise est un phénomène qui ne se pose pas en pratique pour les germes en question.

B. — Résistance acquise a la streptomycine.

Chez les germes aérobies, tels que les entérobactéries isolées d'affections urinaires, l'acquisition de la résistance à la streptomycine se produit fréquemment et de façon brutale. Dans bien des cas, la souche sensible primitive acquiert une forte résistance sans que l'on saisisse les stades intermédiaires, et ceci en des temps très courts.

Au contraire, la streptomycino-résistance du bacille tuberculeux présente un caractère assez particulier. L'apparition est progressive et dépend de nombreux facteurs. L'hétérogénéité des populations microbiennes lui donne souvent un aspect plus quantitatif que qualitatif.

Dans la tuberculose pulmonaire, lorsque la streptomycine est administrée quotidiennement, il est établi que, tant pour le rythme d'apparition que pour l'intensité de la streptomycino-résistance, c'est la durée du traitement et non la dose quotidienne d'antibiotique administrée qui apparaît comme l'élément déterminant. Le rythme du traitement conditionne la fréquence d'apparition de la résistance : elle diminue de façon importante avec les traitements discontinus. Les lésions anatomiques ont une influence certaine sur la résistance, qui est beaucoup plus fréquente chez les malades présentant des lésions cavitaires.

Après arrêt du traitement, on a signalé des cas où la résistance a pu apparaître après un délai de plusieurs semaines. Une fois constituée, elle reste généralement stable lorsqu'elle atteint des taux élevés; par contre, pour des taux faibles, il y a un certain nombre de régressions signalées.

C. — Résistance à la chloromycétine, a l'auréomycine, a la terramycine.

Les cas de résistance acquise pour ces trois antibiotiques sont jusqu'à présent extrêmement rares.

Harvey a observé un cas d'endocardite à *Streptococcus faecalis* sensible à 0,75 µg par cm^3 d'auréomycine avant le traitement et à 6,2 µg par cm^3 après le traitement.

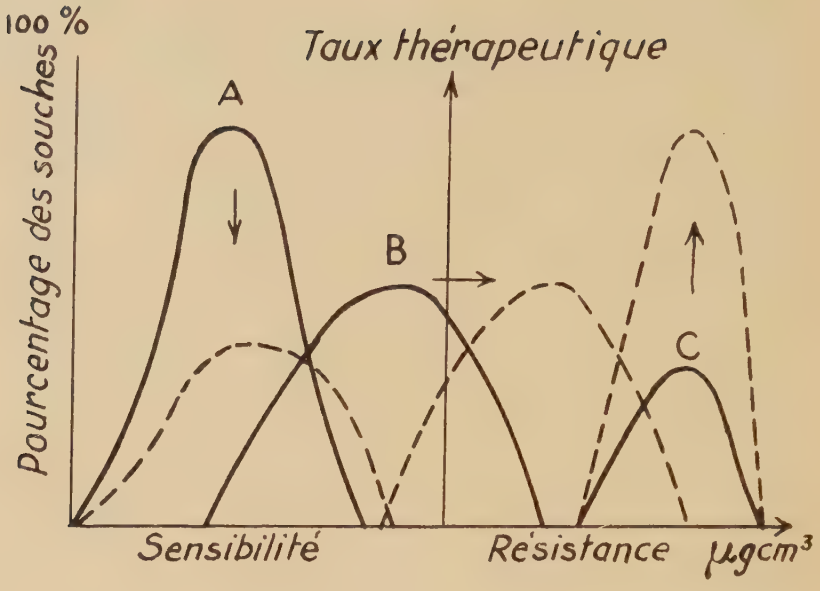
Ces résistances sont faibles et souvent voisines des variations observées dans la détermination du taux de sensibilité.

Toutefois, quel que soit l'antibiotique, l'évolution d'une espèce microbienne vers la résistance est un phénomène caractéristique. Cette évolution présente une certaine constance pour certains germes. Elle est particulièrement nette pour les staphylocoques chez lesquels on voit apparaître actuellement certains types résistants à la plupart des antibiotiques usuels.

II. — ÉTUDE DE L'ÉVOLUTION D'UNE ESPÈCE MICROBIENNE VERS LA RÉSISTANCE.

Lors de l'apparition d'un nouvel antibiotique, si l'on titre un certain nombre de souches d'une espèce microbienne définie, provenant de malades différents, n'ayant pas reçu d'antibiotique, les concentrations inhibitrices nécessaires, reportées sur un graphique, se répartissent suivant une courbe en cloche. Cette courbe peut se situer soit dans la zone thérapeutique, soit en dehors de cette zone, soit à cheval sur ces deux zones.

Si, après quelques années d'usage intensif de cet antibiotique, ce même examen est pratiqué, on remarquera une évolution vers la résistance. Cette évolution sera variable suivant la place des courbes sur les graphiques.



a) Si, au départ, une espèce microbienne est entièrement située dans la zone sensible et si les cas de résistance acquise sont nombreux, on isolera, à côté des souches restées sensibles, un certain nombre de souches présentant une haute résistance. C'est le cas de *Escherichia coli*.

b) Si, initialement, la courbe s'étale de part et d'autre du taux thérapeutique, il se fera une sélection progressive des souches échappant au traitement. Ce phénomène est assez lent à se produire, et il peut être stoppé par des traitements mieux conduits et, en particulier, par des associations d'antibiotiques.

c) Certaines espèces possèdent parfois un pourcentage important de souches hautement résistantes. Par suite de l'élimination des souches sensibles au cours de la mycothérapie, la sélection de ces souches résistantes se produit d'une façon progressive et rapide. Il peut exister pour une espèce particulière une combinaison de ces différents phénomènes. Les staphylocoques pathogènes se sont généralement montrés une des espèces les plus sensibles, lors

de l'apparition de chaque antibiotique; mais c'est aussi parmi eux que la sélection des souches résistantes s'opère le plus rapidement.

Baber et Martin (*) signalent qu'en 1947 les staphylocoques pathogènes résistants à la pénicilline par production de pénicillinase représentaient 10 % des souches isolées sur 3.000 titrages environ. Deux ans plus tard, ce taux passe à 60-80 % dans les hôpitaux et les maternités, alors qu'il n'atteint que 15 à 20 % dans la pratique civile. Chabbert et Terrial (*) montrent que, chez les malades isolés, cette proportion est passée à 55 % en 1951.

Chabbert et Terrial (*) ne se sont pas contentés de relever les pourcentages des souches sensibles et des souches résistantes pour chaque antibiotique. Ils ont étudié la répartition des types de résistance suivant l'ensemble des sensibilités et des résistances de chaque souche pour les différents antibiotiques utilisés, dans un certain nombre de statistiques récentes. Ils remarquent que, pour les souches isolées en 1950 et dans les premiers mois de 1951, les types les plus fréquents sont :

— Le type sensible à tous les antibiotiques;
— Le type résistant à la pénicilline seule;
— Le type résistant à la pénicilline et à la streptomycine.

Depuis, le fait saillant est l'apparition de deux types, en plus des précédents :

— Un type de staphylocoque résistant à tous les antibiotiques;
— Un type sensible uniquement au chloramphénicol.

La dernière statistique montre une augmentation de la résistance des souches à l'égard de la plupart des antibiotiques.

Le mécanisme d'apparition de ces types est discuté. Finland (*) avait signalé que la terramycine était capable

(*) Auteurs cités dans l'article de Chabbert. *Presse Médicale*, 13 décembre 1952.

de sélectionner des staphylocoques résistants dans les flores plurimicrobiennes. Depuis, Chabbert [7] a retrouvé dans la flore fécale de malades traités à la terramycine les deux types de germes résistants (staphylocoque résistant à tous les antibiotiques — et le type sensible uniquement au chloramphénicol). Chabbert [7] remarque qu'il existe une prédominance urinaire et fécale très nette dans l'origine de ces types résistants. Monnier et Kaipainen (*) ont montré l'importance de la résistance croisée entre le chloramphénicol, l'auréomycine et la terramycine; elle se produirait toutefois à un degré bien moindre pour le chloramphénicol, lorsqu'il s'agit de cocci comme le staphylocoque.

L'apparition de ces deux types résistants et leur origine est tout à fait en accord avec ces faits et il est probable qu'ils sont susceptibles de prendre naissance par résistance croisée dans le milieu intestinal des malades traités *per os* par ces antibiotiques.

Cette évolution, si elle se confirme, posera un problème thérapeutique difficile à résoudre.

(*) Auteurs cités dans l'article de Chabbert. *Presse Médicale*, 13 décembre 1952.

CHAPITRE II

SUBSTITUTIONS DE GERMES ET MODIFICATIONS DE LA FLORE MICROBIENNE SOUS L'INFLUENCE DES ANTIBIOTIQUES

Dans la pratique courante, les antibiotiques, dont on fait un emploi des plus larges, peuvent dans certains cas sélectionner une flore microbienne résistante d'emblée et sans adaptation préalable. Si les conditions lui sont favorables, cette souche microbienne s'installe dans des lésions organiques infectées auparavant. Ainsi, la disparition de l'espèce sensible sous l'action de l'antibiotique s'accompagne, dans certains cas, de l'installation d'une flore résistante. Simulant une rechute ou une résistance acquise, le microbe sélectionné peut alors occuper la place avec ténacité et entretenir la chronicité de la maladie.

Cette sélection se produisant sur un organisme fatigué trouve un terrain favorable. Les germes, doués d'une certaine potentialité pathogène et insensibles à l'antibiotique, se trouvent libérés de la concurrence vitale qui règne normalement au sein d'une population microbienne. La multiplication se fait plus active. Elle n'est plus limitée par aucune entrave. Ces microbes, trouvant en un point de l'organisme une lésion déjà préparée, ne peuvent faire

mieux que de profiter de l'occasion favorable. Ils s'installent et continuent l'œuvre de destruction commencée par un autre germe.

Ainsi, des examens pratiqués tout au long d'une affection microbienne chronique montreront un *Proteus* succédant à un *Escherichia coli* ou à un staphylocoque; ou bien un entérocoque à un coliforme.

Le mécanisme est chaque fois provoqué par la sélection antibiotique.

Ainsi, Ellard M. Yow (Houston, Texas) [10] a observé chez 43 malades en traitement ou après traitement l'apparition d'infections secondaires dues à un développement de *Proteus* et de *Pseudomonas aeruginosa*. Ces auteurs constatent que les antibiotiques sont bien souvent inactifs sur ces germes qui, malgré leur faible pouvoir pathogène, jouent après leur multiplication un rôle important dans le processus infectieux. Ils rapportent 3 méningites, 1 péritonite, 5 septicémies, 5 affections pulmonaires, 4 pleurales, 3 articulaires, 24 de l'appareil urinaire.

En France, Brisou [5] a publié le premier quatre observations-types sur les affections à microbismes substitués et sélectionnés, dans un article de la *Presse Médicale* du 15 mars 1952. Y. Couturier, dans sa thèse de doctorat en médecine sur les flores microbiennes substituées et sélectionnées publie 18 observations d'un intérêt tout particulier.

Le facteur anatomique semble être la condition nécessaire de cette évolution vers des espèces de plus en plus résistantes. Ainsi, Kimmelmann, dans 17 cas d'affections urinaires, n'a vu apparaître des germes résistants aux antibiotiques utilisés que dans les cas où une lésion locale le permettait.

Il faut toutefois rattacher au même ordre de phénomènes la sélection de flores résistantes qui s'opère dans les cavités naturelles et non pathologiques, ou sur la peau des sujets traités par les antibiotiques. C'est ainsi qu'il

y a sélection de streptocoques et de staphylocoques résistants dans les voies aériennes supérieures des sujets traités par la pénicilline; sélection d'entérobactéries résistantes dans les selles des tuberculeux traités par la streptomycine; sélection d'une flore vaginale résistante chez les malades traitées par l'auréomycine, le chloramphénicol ou la terramycine. Ces modifications ne sont pas directement pathogènes, mais elles contribuent à augmenter le nombre de souches résistantes qui peuvent être à l'origine d'infections qui échapperont au traitement.

Nous serons ainsi amené à étudier et à suivre, dans les affections microbiennes chroniques :

— La flore des syndromes urinaires.

— La flore associée des affections pulmonaires.

— La flore du tractus intestinal.

Les modifications et leur interprétation se présentent sous des formes très diverses suivant la nature des germes et l'état du terrain.

FLORE DES SYNDROMES URINAIRES

La flore des syndromes urinaires a retenu particulièrement l'attention de FINLAND qui a signalé le premier, en 1945, les modifications rapides sous l'influence des antibiotiques.

Depuis, ces modifications ont été observées par tous ceux qui ont suivi la flore et la sensibilité des germes chez les malades traités, quel que soit l'antibiotique utilisé. L'apparition d'espèces nouvelles résistantes se fait quelquefois pendant le traitement, mais le plus souvent les urines restent stériles et une flore ne se reconstitue que peu après.

Nous nous sommes particulièrement intéressé aux affections bactériologiques de l'arbre urinaire, où la mise en évidence des substitutions de germes ne s'expose pas aux discussions et aux critiques possibles pour les affections pulmonaires ou gastro-intestinales. En effet, les urines chez un individu sain sont stériles; au contraire, les selles et les crachats contiennent normalement plusieurs variétés de germes dépourvus de rôle pathogène, et il peut parfois être difficile de prouver que l'affection est due au germe prédominant de la flore. De plus, les affections urinaires, particulièrement nombreuses, offrent un grand intérêt, car elles évoluent en « vase clos », et les facteurs extrinsèques tels que les manipulations ou les pansements n'interviennent pas dans les modifications microbiennes que l'on peut observer.

Nous avons suivi 109 malades *présentant cliniquement des affections urinaires susceptibles de présenter des substitutions de germes.*

Leurs urines étaient régulièrement suivies. Prélevées aseptiquement par sondage, elles étaient stérilement recueillies et centrifugées.

Le culot de centrifugation était soumis aux examens microscopiques suivants :

— Un examen direct.

— Un examen après coloration au bleu de méthylène.

— Un examen après coloration de Gram.

— Un examen après coloration de Ziehl.

Les germes décelés par cet examen direct étaient, après culture, isolés, identifiés et testés aux antibiotiques.

Les observations que nous publions montrent bien le rôle important des substitutions de germes au cours des échecs thérapeutiques et en particulier de l'antibiothérapie chez certains malades atteints d'affections microbiennes et présentant momentanément un état physiologique déficient.

Observation I

M. E. J., 39 ans. Hospitalisé pour cystite, pollakiurie, pyurie, hématurie.

21 octobre 1952. — Les urines prélevées aseptiquement ont un culot de centrifugation constitué d'assez nombreux leucocytes, de rares hématies et de quelques cellules rénales.

L'examen microscopique nous montre de nombreux cocci prenant le Gram.

L'identification reconnaît un *Streptococcus faecalis.*

Le test de sensibilité aux antibiotiques le révèle sensible à la chloromycétine (diamètre d'inhibition = 31 mm).

Traitement : chloromycétine.

28 octobre 1952. — La culture des urines reste stérile.

6 février 1953. — Le malade est à nouveau hospitalisé.

Le culot de centrifugation contient de nombreux polynucléaires et quelques cellules de desquamation.

L'identification de la flore révèle, après culture, un *Proteus vulgaris*.

Ce germe, testé, s'avère résistant à tous les antibiotiques.

Observation II

M. F. M., 52 ans. Hospitalisé pour syndrome grave entéro-rénal, avec pyurie à colibacilles, accès fébriles, hépatonéphrite s'accompagnant d'hyperazotémie. La thérapeutique précédente (sulfamides, pénicilline, streptomycine) est restée inefficace.

5 février 1953. — L'identification de germe après mise en culture du culot de centrifugation permet de dire qu'il s'agit d'un *Escherichia coli* type I.

Un test de sensibilité aux antibiotiques montre que ce germe est sensible à la chloromycétine (diamètre d'inhibition = 35 mm). Thérapeutique : chloromycétine. Amélioration rapide.

10 mars 1953. — Le malade présente à nouveau les mêmes symptômes. L'examen cyto-bactériologique des urines met en évidence un *Streptococcus faecalis*.

Ce germe, testé, est résistant à la chloromycétine.

Observation III

M^me^ D., 48 ans. Hospitalisée pour crises douloureuses au niveau de la région lombaire droite et crises intermittentes de pollakiurie.

7 juillet 1952. — Culot de centrifugation des urines constitué de très nombreux leucocytes et de quelques hématies. La culture est stérile. Absence de B. K. Inoculation au cobaye négative.

22 septembre 1952. — Le culot de centrifugation contient de nombreux leucocytes et de nombreuses hématies. Les éléments de la flore microbienne sont des cocci Gram positif

et des bacilles mobiles Gram négatif. L'identification, après culture, montre qu'il y a trois germes en présence : *Staphylococcus aureus, Streptococcus faecalis, Escherichia coli* type II.

Un test global de la sensibilité aux antibiotiques indique que les trois germes sont sensibles à la chloromycétine (diamètre d'inhibition = 28 mm).

Thérapeutique : chloromycétine.

14 octobre 1952. — Les urines sont troubles, leur important culot de centrifugation rougeâtre est constitué de nombreux cristaux d'urate de sodium, de quelques cristaux de phosphates ammoniaco-magnésiens, de rares leucocytes, de rares cellules épithéliales et de très rares hématies.

La flore microbienne est abondante et composée de cocci Gram positif.

L'identification permet de dire qu'il s'agit de *Streptococcus faecalis*. Le staphylocoque et le colibacille ont disparu.

Un test de sensibilité aux antibiotiques montre que ce germe est résistant à tous les antibiotiques.

Observation IV

M^me^ H. G., 23 ans. Hospitalisée pour pyélonéphrite gravidique.

30 avril 1952. — Le culot de centrifugation des urines est constitué de très nombreux polynucléaires peu altérés, de cristaux d'oxalate de chaux et de quelques cellules de desquamation. Absence d'hématies et de cylindres.

La flore microbienne est constituée de très nombreux bacilles mobiles Gram négatif. L'identification en fait un *Escherichia coli* type II.

Ce germe est resté insensible à toutes les thérapeutiques précédentes (sulfamides, pénicilline à forte dose).

Un test de sensibilité aux antibiotiques le révèle sensible à la chloromycétine (diamètre d'inhibition = 32 mm).

Thérapeutique : chloromycétine.

7 mai 1952. — La culture des urines est stérile.

26 juillet 1952. — Nouvelle hospitalisation pour les mêmes symptômes.

Un examen bactériologique montre qu'il ne s'agit plus d'un *Escherichia coli* type II, mais d'un *Pseudomonas aeruginosa.*

Ce germe, testé, est résistant à tous les antibiotiques *in vitro.*

Observation V

M^lle^ S. D., 25 ans. Ptose du rein droit. Hydronéphrose consécutive du rein gauche.

12 mai 1952. — Le culot de centrifugation des urines est constitué de très nombreuses hématies, de quelques cellules rénales, d'assez nombreux leucocytes; présence de nombreux cristaux de phosphates ammoniaco-magnésiens et de phosphates amorphes.

L'examen bactériologique permet de déceler l'existence d'un bacille mobile Gram négatif. La culture permet d'identifier un *Escherichia coli* type I.

Traitement : Rufol. Après quelques jours de traitement, amélioration; les urines redeviennent claires et stériles.

24 juillet 1952. — La malade présente à nouveau les mêmes douleurs. Les urines prélevées aseptiquement sont légèrement troubles. Le culot de centrifugation est constitué de nombreux cristaux de phosphates ammoniaco-magnésiens et de phosphates amorphes, de nombreux leucocytes et de quelques hématies.

L'examen microscopique de la flore microbienne ne montre plus des bacilles Gram négatif, mais des cocci Gram positif.

L'identification montre qu'il s'agit d'un *Staphylococcus aureus.*

Observation VI

M. G., 26 ans. Hospitalisé pour accès intermittents de pyélonéphrite.

8 septembre 1952. — L'examen du sédiment des urines indique la présence de très nombreux leucocytes, de quelques hématies.

L'examen microscopique signale la présence de cocci Gram positif. L'identification révèle un *Streptococcus faecalis.*

Le test de sensibilité montre que ce germe résiste à tous les antibiotiques, sauf à la chloromycétine (diamètre d'inhibition = 29 mm).

Thérapeutique : chloromycétine.

10 octobre 1952. — Pas d'amélioration du malade.

La mise en culture du culot de centrifugation et l'identification de la flore révèlent la présence d'un autre germe : *Escherichia coli* type I.

Observation VII

M. H. B., 26 ans. Hospitalisé pour albuminurie et crises de cystite.

10 avril 1952. — Prélevées aseptiquement, les urines ont un culot de centrifugation constitué de nombreux cristaux d'oxalate de chaux, d'assez nombreux leucocytes, de quelques hématies et de rares cellules épithéliales. Présence de bacilles mobiles Gram négatif à l'examen microscopique.

Identification : *Proteus vulgaris.*

Le test de sensibilité aux antibiotiques indique que ce germe est sensible à l'auréomycine (28 mm) et à la chloromycétine (33 mm).

Thérapeutique : chloromycétine et terramycine.

21 avril 1952. — La culture du culot de centrifugation reste stérile.

16 juin 1952. — Le malade présente les mêmes symptômes; le culot de centrifugation est constitué de quelques hématies et d'assez nombreux polynucléaires peu altérés.

La flore se compose de cocci Gram positif. L'identification montre qu'il s'agit de deux germes : *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis.*

Observation VIII

M^me^ B. M., 74 ans. Hospitalisée en janvier 1951 pour cystite et pollakiurie intense. Infiltration des nerfs sacrés. Section des nerfs érecteurs.

13 juin 1950. — Traces d'albumine dans l'urine. Le culot de centrifugation est constitué de quelques cristaux de phosphates bicalciques, de quelques cellules de desquamation, de rares leucocytes et de très rares hématies. L'examen microscopique indique un bacille mobile Gram négatif. L'identification, après culture, montre qu'il s'agit d'un *Escherichia freundii* type I.

Le test de sensibilité aux antibiotiques n'est pas pratiqué.

Thérapeutique : pénicilline - streptomycine.

18 janvier 1951. — Un examen cyto-bactériologique des urines signale toujours le même germe.

Mai 1952. — Nouvelle hospitalisation pour cystalgie persistante, pollakiurie diurne et nocturne.

L'agent en cause est toujours *Escherichia freundii* type I.

Le test de sensibilité révèle que le germe est sensible à la chloromycétine (32 mm) et à la terramycine (27 mm).

Thérapeutique : chloromycétine-terramycine.

3 juin 1952. — Le culot de centrifugation est constitué de nombreux leucocytes, de quelques hématies et de quelques cellules épithéliales. La culture est stérile.

23 juin 1952. — Nous trouvons de très nombreux leucocytes, d'assez nombreuses hématies et quelques cellules épithéliales.

L'identification de la flore révèle un *Streptococcus faecalis.*

Thérapeutique : chloromycétine-auréomycine.

30 juillet 1952. — Une nouvelle identification signale toujours la présence de *Streptococcus faecalis.*

Le test de sensibilité le révèle, toutefois, sensible à l'auréomycine (29 mm).

Thérapeutique : auréomycine. Amélioration légère de la malade.

10 octobre 1952. — La malade présente de nombreuses crises insidieuses et l'identification de germes permet de déceler : *Klebsiella pneumoniae, Streptococcus faecalis.*

Les deux germes, après séparation, se montrent résistants à tous les antibiotiques.

Observation IX

M. A. E., 71 ans, présente une plaie qui se cicatrise mal, après ablation d'un polype vésical.

10 octobre 1952. — Les urines troubles ont un important culot de centrifugation constitué de très nombreux leucocytes plus ou moins altérés et de rares hématies.

A l'examen microscopique, nous voyons de rares bacilles Gram négatif mobiles.

L'identification du germe, après culture, donne un *Escherichia coli* type I.

Le test de sensibilité aux antibiotiques le révèle sensible à la chloromycétine (diamètre d'inhibition = 36 mm).

Thérapeutique : chloromycétine.

Les jours suivants les urines se clarifient et le 19 octobre la culture est stérile.

25 novembre 1952. — A nouveau les urines sont troubles; le sédiment est important et est constitué d'assez nombreuses cellules pavimenteuses et de nombreux leucocytes.

L'identification de la flore signale deux germes : *Streptococcus faecalis, Pseudomonas aeruginosa.* Les deux germes sont résistants *in vitro* aux antibiotiques.

Thérapeutique : chloromycétine-terramycine.

Les urines restent plus ou moins troubles. Une identification pratiquée le 12 décembre, après culture, ne révèle la présence que du *Pseudomonas aeruginosa.* Le *Streptococcus faecalis* semble avoir disparu.

Observation X

M. P. H., 21 ans. Hospitalisé pour douleurs lombaires..

11 octobre 1952. — Les urines, prélevées par sondage, ont un culot de centrifugation constitué de nombreux leucocytes, de très rares hématies et de très rares cellules de desquamation.

L'examen microscopique révèle la présence de cocci Gram positif.

L'identification montre que deux germes sont en présence : *Staphylococcus aureus, Streptococcus faecalis.*

Un test global de sensibilité de ces deux germes aux antibiotiques montre les diamètres d'inhibition suivants : chloromycétine = 26 mm, auréomycine = 24 mm, terramycine = 26 mm.

Traitement : chloromycétine-auréomycine.

30 octobre 1952. — L'identification de la flore microbienne, après culture, révèle toujours la présence de deux germes : *Streptococcus faecalis, Escherichia coli* type I. Le *Staphylococcus aureus* a disparu.

Un test de sensibilité révèle que les deux germes sont sensibles à la terramycine (28 mm).

Thérapeutique : terramycine.

20 novembre 1952. — Le culot de centrifugation contient toujours d'assez nombreux leucocytes.

L'identification révèle un *Escherichia coli* type I.

Le test montre que ce germe est résistant à tous les antibiotiques.

Observation XI

M^me^ D. H., 57 ans. Hospitalisée pour cystite, pollakiurie, douleurs à la miction. A déjà présenté une bacillose rénale. La néphrectomie, pratiquée le 21 avril 1952, a été suivie d'une amélioration.

3 octobre 1952. — Le culot de centrifugation se compose de nombreux polynucléaires et d'assez nombreuses hématies.

Absence de B. K. Inoculation au cobaye négative.

L'examen microscopique révèle la présence de bacilles mobiles Gram négatif.

L'identification montre qu'il s'agit de *Escherichia coli* type I, le test de sensibilité indique que ce germe est sensible à la chloromycétine (26 mm) et à la terramycine (24 mm).

Thérapeutique : chloromycétine et terramycine.

25 novembre 1952. — Le culot de centrifugation est constitué de nombreux leucocytes, de très rares hématies, de

rares cellules de desquamation. Le germe présent est un coccus Gram positif.

L'identification montre qu'il s'agit d'un *Streptococcus faecalis*.

Ce germe est sensible *in vitro* à la chloromycétine (26 mm).

Thérapeutique : chloromycétine.

10 janvier 1953. — La flore microbienne des urines, après identification, est constituée de : *Pseudomonas aeruginosas, Streptococcus faecalis*.

Ces deux germes sont résistants *in vitro* à tous les antibiotiques.

Observation XII

M^me^ B. M., 70 ans, présente une vaginite accompagnée de cystite. Pollakiurie diurne et nocturne. Le frottis vaginal ne contient pas de germe.

10 octobre 1952. — Le culot de centrifugation est constitué de quelques leucocytes et de très rares cellules rénales. L'examen microscopique indique la présence de bacilles mobiles Gram négatif.

L'identification montre qu'il s'agit d'un *Proteus vulgaris*.

Ce germe, testé aux antibiotiques, est sensible à la chloromycétine (diamètre d'inhibition = 29 mm).

Thérapeutique : chloromycétine.

15 décembre 1952. — Le culot de centrifugation est constitué de nombreux leucocytes. L'examen microscopique ne montre plus de bacilles mobiles Gram négatif, mais des cocci Gram positif.

L'identification met en évidence un *Streptococcus faecalis*.

Ce germe, testé *in vitro*, est résistant à tous les antibiotiques.

Observation XIII

M^me^ E. M., 62 ans. Hospitalisée pour cystite, pollakiurie, avec brûlures à la miction.

30 août 1952. — Le culot de centrifugation est constitué de très nombreux leucocytes, de nombreuses hématies, de

nombreuses cellules de la vessie. Présence de bacilles Gram négatif mobiles.

L'identification montre qu'il s'agit de *Escherichia freundii* type I.

Ce germe, testé, est sensible à la chloromycétine (32 mm).

Thérapeutique : chloromycétine.

15 octobre 1952. — Le culot de centrifugation contient de très nombreux leucocytes et de rares hématies. La flore microbienne n'est plus constituée de bacilles mobiles mais de cocci Gram positif.

L'identification montre qu'il s'agit d'un *Staphylococcus aureus.*

Observation XIV

M^me^ H. M., 35 ans. Hospitalisée en 1947 pour douleurs lombaires, cystite, affaiblissement général consécutif. L'urètre de son rein droit est coudé par un vaisseau sanguin. Il y a ainsi formation d'une anse qui permet l'accumulation d'une certaine quantité d'urine dans le bassinet. Le germe, isolé, est identifié comme un *Escherichia coli* type I.

La malade est traitée successivement à l'Amphovaccin Ronchèse, au Rufol, puis plus tard à la streptomycine. L'amélioration n'est que passagère.

Le germe, testé aux antibiotiques, se révèle sensible à la chloromycétine (diamètre d'inhibition = 31 mm).

Thérapeutique : chloromycétine.

18 décembre 1952. — La malade présente une crise assez aiguë. L'examen cyto-bactériologique des urines montre de très nombreux polynucléaires peu altérés. La flore microbienne est constituée de cocci Gram positif. Après culture, on ne retrouve pas de bacilles.

L'identification montre qu'il s'agit d'un *Streptococcus faecalis.*

Cette malade présente des crises légères lors de tout affaiblissement de son état général. Au contraire, quand son état physiologique est florissant elle ne présente plus aucun symptôme.

Ce que nous venons d'observer au cours des affections bactériologiques de l'appareil urinaire se produit de la même façon au niveau d'une plaie et dans une plèvre.

Nous pourrons constater ce même phénomène de sélection et de substitution :

1° Au cours des affections pulmonaires; mais ce phénomène se complique par la présence d'une flore banale associée.

2° Dans les affections intestinales, où la complexité est encore plus grande en raison de l'importance de la flore microbienne dont la suppression peut causer des accidents graves.

FLORE ASSOCIÉE DES AFFECTIONS PULMONAIRES

La flore associée des affections pulmonaires subit des modifications importantes au cours d'un traitement aux antibiotiques. Il est fréquent de voir des bacilles Gram négatif résistants remplacer des pneumocoques ou des streptocoques chez des malades traités par la pénicilline. Il est nécessaire d'associer plusieurs antibiotiques qui agissent sur l'ensemble des germes.

Cependant, dans ces flores, beaucoup d'espèces ne semblent jouer qu'un rôle de saprophytes. Un traitement actif sur l'espèce pathogène est capable d'amener la guérison. Ainsi, un traitement par l'auréomycine actif sur les anaérobies de la flore de VEILLON et sur les streptocoques est susceptible d'agir malgré la présence de *Proteus* résistants; de même, un traitement par la streptomycine actif sur pneumocoque sera efficace malgré la présence de bacilles de FRIEDLANDER résistants.

FLORE DU TRACTUS INTESTINAL

La flore microbienne du tube digestif est aussi riche que variée. Malgré la multitude des germes qui la constituent, aérobies et anaérobies, Gram positif et Gram négatif, il y règne un certain équilibre. Les microbes ont les uns sur les autres des actions réciproques. C'est ainsi que certaines espèces élaborent des substances particulières comme les colicines de GRATIA et FRÉDÉRICQ, véritables antibiotiques et facteurs limitants, qui jouent un rôle important dans le maintien de l'équilibre microbien du tube digestif.

Un antibiotique puissant et polyvalent, tel que la chloromycétine, l'auréomycine ou la terramycine, administré *per os*, dans le but de traiter soit une affection purement intestinale, soit une tout autre affection, provoque des modifications profondes et rapides de la flore intestinale. Cet antibiotique supprime une partie de la flore ainsi que les facteurs limitants dont nous venons de parler.

Si l'on suit quotidiennement l'évolution des bactéries dans les selles des sujets recevant un antibiotique *per os*. on voit dans la majorité des cas, en peu de jours, leur nombre diminuer pour atteindre des taux très bas, inférieurs à 1.000 germes par gramme de selles humides. A partir de ce moment, une flore intestinale va tendre à se constituer, mais de façon très différente suivant l'antibiotique et la dose utilisés. Il peut simplement réapparaître des entérobactéries nouvelles. Ainsi, Y. CHABBERT, en suivant la flore microbienne intestinale au cours de

traitements par antibiotiques administrés *per os*, a constaté les modifications profondes apportées à cette flore. Il a observé, dans un cas traité au chloramphénicol, le remplacement de la flore primitive composée de *Shigella alkalescens* et de *Escherichia freundii* par un *Escherichia coli* sensible et un *Proteus* résistant; avec la streptomycine, il a observé deux fois le remplacement en trois jours d'un *Escherichia coli* sensible par un *Aerobacter aerogenes* résistant associé à un *Proteus* sensible; avec l'auréomycine, l'apparition d'un *Proteus* est un phénomène courant.

Ces modifications que l'on pourrait qualifier de superficielles, par opposition aux modifications profondes faisant disparaître totalement les entérobactéries, sont souvent assez paradoxales. Ainsi, les espèces apparues ne sont pas toujours résistantes à l'antibiotique utilisé. Un deuxième traitement est capable d'amener un effet dépresseur sur la flore Gram négatif analogue au premier, bien que des espèces soient résistantes à des taux élevés d'antibiotique. Ce fait a été signalé avec la streptomycine par Pulaski et par Welch. Enfin, un nouveau changement de la flore, qui tend à rétablir les espèces primitives, ne tarde pas à intervenir quelques jours après l'arrêt de l'antibiotique.

S'il est bien certain qu'un antibiotique pour être actif dans le milieu intestinal doit agir sur la flore, il est difficile d'établir un parallélisme entre les modifications de celle-ci et un effet thérapeutique.

Si l'on peut considérer que dans le cas où un syndrome intestinal est lié à la prédominance et à la pullulation anormale de certaines espèces microbiennes, et si une diminution du microbisme et un changement de flore peuvent s'accompagner de résultats thérapeutiques intéressants, le remplacement de cette flore peut, dans certains cas, amener la continuation des troubles ou les augmenter.

Les troubles amenés au milieu intestinal, consécutifs à

l'administration d'antibiotiques *per os,* sont souvent plus profonds. La disparition des entérobactéries peut être presque totale pendant la durée du traitement. La nouvelle flore peut être constituée essentiellement de cocci Gram positif résistants, comme certaines souches de staphylocoques et d'entérocoques. Ces germes peuvent être à l'origine de syndromes graves comme l'a signalé Jambon. D'une manière plus générale, la flore nouvelle est constituée d'anaérobies sporulées, de moisissures, de levures hautement résistantes.

Bien que les antibiotiques montrent une efficacité remarquable en pathologie digestive et que les accidents causés par les modifications profondes de la flore intestinale soient encore rares à l'heure actuelle, il ne semble pas inutile de suivre bactériologiquement l'évolution des selles des malades traités pour savoir attribuer certains troubles à cet aspect particulier de la résistance.

Les inconvénients des modifications de la flore microbienne du tractus intestinal, sous l'influence de la mycothérapie, peuvent être étendus à un point de vue très général. Les observations se multiplient où l'on peut constater qu'un antibiotique donné correctement n'empêche pas le développement d'une affection secondaire. Il semble même que, dans certains cas, cette infection secondaire se développe d'autant plus vite qu'elle trouve le champ libre devant elle, par suppression de l'antagonisme microbien. Ces faits sont surtout manifestes quand l'infection secondaire est due à des organismes plus différenciés, c'est-à-dire des *levures.* D'ailleurs, les manifestations fongiques consécutives à la thérapeutique antibiotique sont bien reconnues à l'heure actuelle.

AFFECTIONS FONGIQUES

Bien que de nombreuses références doivent être trouvées dans la littérature américaine, peu d'exemples ont été enregistrés dans ce pays.

En 1949, Foley et Winter pensent que la pénicilline puisse favoriser le développement et le pouvoir pathogène d'espèces *Candida.*

En 1950, Harris [20] remarqua, chez 91 femmes et 44 hommes atteints de brucellose qu'il avait traités par l'auréomycine et le chloramphénicol, de nombreux effets secondaires : 60,7 % des femmes et 19,3 % des hommes se plaignirent de nausées, de vomissements, de douleurs précordiales, de diarrhée. La fréquence et la gravité des troubles gastro-intestinaux furent plus grandes après l'auréomycine qu'après le chloramphénicol. Chez la moitié de ces malades prenant chaque jour 2 à 4 g de ces antibiotiques, les selles étaient pâteuses et peu odorantes; les muqueuses de la cavité buccale (pharynx, lèvres, langue, joues) étaient le siège de petites ulcérations. Chez 24 femmes, ces lésions buccales étaient accompagnées de lésions de vulvite et de vaginite et d'une irritation périanale. A la surface de ces lésions, Harris put déceler le *Candida albicans* et, selon lui, le développement secondaire de cette levure était dû à la destruction de la flore microbienne intestinale par l'action de l'auréomycine et du chloramphénicol.

Woods, Manning, Patterson [51] observèrent 25 cas de

moniliase après l'administration de pénicilline, d'auréomycine et de chloramphénicol.

20 cas relatifs au rhino-pharynx.

3 cas relatifs à l'intestin.

2 cas relatifs à l'appareil broncho-pulmonaire.

La présence de *Monilia* fut confirmée par la culture. Les malades présentaient des ulcérations des muqueuses buccales, un chevelu de la langue, du muguet et une diarrhée persistante. Chez les malades atteints de diarrhée, on trouva, en abondance, du *Candida albicans* dont on put isoler quatre espèces différentes. Woods pense que la suppression des bactéries qui rivalisent continuellement avec le *Candida albicans* coexistant au point de vue nourriture, semble être un facteur important dans le développement de ces infections.

La perturbation apportée à la synthèse des vitamines due à l'altération de la flore microbienne gastro-intestinale au cours d'un traitement aux antibiotiques administrés *per os*, peut avoir une certaine importance. Ainsi, Harris, en 1950, obtient des résultats par administration du complexe « B » dans le traitement et la prophylaxie des moniliases consécutives à un traitement antibiotique.

Tomaszenski [46], sur 126 malades traités par le chloramphénicol et par l'auréomycine, atteints d'effets secondaires, remarque que ces complications sont plus fréquentes chez les femmes et qu'elles se développent plus rapidement encore chez les malades qui ont reçu auparavant de la pénicilline et de la streptomycine. Les frottis des ulcérations linguales montrent une flore fongique abondante composée presque uniquement de *Candida albicans* et une disparition complète de la flore microbienne normale de la bouche.

En 1951, le Conseil de Pharmacie et de Chimie de l'American Medical Association demande que dans la notice qui accompagne les antibiotiques, tels que le chloramphénicol, l'auréomycine et la terramycine, il soit fait

mention de ces faits et qu'il soit dit : « Ces antibiotiques ont un pouvoir bactériostatique élevé pour un grand nombre de bactéries; mais, parmi celles-ci, il en est certaines dont la suppression est susceptible de favoriser le développement des *Monilia* ou d'autres levures de la flore normale ou anormale de l'organisme ».

La plupart de ces infections développées secondairement sont bénignes. Cependant, elles peuvent amener des complications graves. Ainsi, Oblatt et ses collaborateurs ont rapporté 6 cas de moniliase pulmonaire, Zimmerman 3 cas d'endocardite, dont un mortel dû à *Candida albicans*, et deux dus à l'*Aspergillus*.

Gausewitz et ses collaborateurs ont publié un cas de mort chez un garçon de dix ans, où ils trouvèrent des lésions du myocarde, du poumon, des reins et de la thyroïde dues à *Candida albicans*.

Dans le *British Medical Journal*, Abbot, Fernando et Curling [1] publient le cas d'une femme hospitalisée le 9 février 1951 au cours d'une épidémie de grippe avec un diagnostic de bronchopneumonie post-grippale. Trois jours avant son admission, elle eut une poussée de purpura. Son état était fébrile, ses crachats rares, mucopurulents, non sanguinolents. L'examen bactériologique des crachats dénote à l'examen direct l'absence de B. K. et, après culture, la présence de colibacilles sensibles à la pénicilline et au chloramphénicol, et la présence de *Candida albicans*.

Une radiographie pulmonaire montre la présence d'ombres avec une légère opacité dans les deux zones inférieures.

Soumise à un traitement de 500.000 u. de pénicilline toutes les huit heures, on note une amélioration et la température baisse au bout du deuxième jour; mais, au cinquième jour, malgré l'absence de signes cliniques, la température remonte.

La pénicilline est arrêtée. On administre du chloram-

phénicol : 3 g dans une première prise et 0,50 g toutes les six heures.

Au dixième jour, la température est à 37°8, la malade se plaint d'une douleur pleurale du côté droit. Les crachats, encore rares, deviennent purulents et striés de sang.

La radiographie montre une augmentation de l'opacité au sommet gauche, et les zones moyennes semblent présenter une cavité irrégulière à fines parois.

Une analyse de crachats montre la présence de pus, de rares levures et de filaments de *Candida albicans*.

La malade meurt le seizième jour après son admission.

Un examen histologique *post-mortem* d'une coupe du poumon gauche montre une cavité avec présence d'un mycélium fongique et de conidies occasionnelles. Le poumon droit montre une hépatisation avec présence de fragments de mycélium.

Un examen bactériologique de la cavité pulmonaire montre un développement important d'*Aspergillus fumigatus* type *Fresenius*, avec en même temps une culture insignifiante de *Candida albicans*. On note l'absence de staphylocoque, de streptocoque hémolytique.

La cause de la mort semble due à une toxémie consécutive à une bronchopneumonie post-grippale, compliquée par la suite d'une infection à *Aspergillus*. Ni le purpura, ni la présence de *Candida albicans* ne semblent y contribuer de façon significative.

Il semble, cependant, que l'accord ne soit pas réalisé sur la pathogénie de ces complications.

Pour Lipnik et ses collaborateurs, le *Candida albicans* étant l'hôte normal des voies respiratoires et du tube digestif, il est probable qu'on le trouve en égale quantité chez tous les malades soumis aux antibiotiques, qu'ils fassent ou non des complications ou des lésions des muqueuses buccales. D'autre part, la moniliase est rare, relativement au nombre de malades traités par les antibiotiques.

Les expériences de laboratoire que ces auteurs ont poursuivies ne leur ont pas permis de dire que les antibiotiques avaient des effets stimulants sur le *Candida albicans*. Elles leur ont montré au contraire, qu'*in vitro*, l'augmentation de la croissance était due aux phosphates contenus dans les capsules d'auréomycine.

Klingmann pense que le pullulement du *Candida albicans*, comme les effets secondaires d'un traitement antibiotique, peuvent être dus aussi bien à des réactions allergiques, à une déficience en vitamines, qu'à une complication de la thérapeutique instituée. Pour lui, le fait d'isoler le *Candida albicans* des lésions n'est pas un argument de grand poids.

Il n'en reste pas moins que la moniliase est une complication de la thérapeutique antibiotique et qu'il reste à trouver des mesures préventives de cette complication, en adjoignant à l'antibiotique soit une vitamine, soit un antifongique qui inhibe le *Candida albicans* et les levures.

MÉTHODE DE TRAVAIL

IDENTIFICATION DES GERMES AÉROBIES DE CONTAMINATION COURANTE ET TEST DE SENSIBILITÉ DES GERMES AUX ANTIBIOTIQUES

Dès le début de nos recherches, qui ont nécessité de nombreuses identifications de souches microbiennes, nous avons éprouvé de grandes difficultés dans le choix d'une méthode de travail.

Comment nous faire une idée de prime abord sur le germe que nous venons d'isoler; quelle technique mettre en œuvre pour en assurer l'identification précise et sûre ? Telles étaient les questions auxquelles nous étions bien embarrassé de répondre.

Pour y parvenir, nous avons mis au point une méthode de travail qui a pu nous permettre de diminuer les tâtonnements et nous indiquer la marche à suivre en partant des caractères les plus simples du germe. Nous avons essayé de construire une « clef bactériologique » qui relie ces premiers caractères, à savoir :

— La mobilité,
— La morphologie,
— La coloration de Gram,
— La coloration de Ziehl (éventuellement),

à une identification aussi précise que poussée.

Laissant complètement de côté la classification de BERGEY, *la classification de* PRÉVOT, *et toute systématique*

bactérienne et, partant de la mobilité, de la morphologie, de la coloration de Gram, et éventuellement de la coloration de Ziehl, nous avons classé *les germes aérobies de contamination courante en huit grands groupes :*

1° Cocci Gram positif.
2° Cocci Gram négatif et formes affines.
3° Coccobacilles Gram négatif, en navettes.
4° Bacilles mobiles Gram négatif.
5° Bacilles immobiles Gram négatif.
6° Bacilles mobiles Gram positif.
7° Bacilles immobiles Gram positif.
8° Bacilles Ziehl positif.

(Pour les germes anaérobies, nous nous rapporterons à la classification de PRÉVOT.)

Dans chaque groupe nous avons placé :

1° A la gauche du tableau, les milieux qui rendent possible la culture de tous les germes qui peuvent s'y rencontrer, et les milieux qui mettent en évidence quelques caractères différentiels et permettent d'établir une idée de présomption.

2° A la droite du tableau, les milieux, les tests biochimiques et sérologiques, le pouvoir pathogène expérimental. Cet ensemble permettant de confirmer le diagnostic de présomption et d'établir un diagnostic précis.

Notre travail sur les flores microbiennes substituées nous impose des analyses bactériologiques effectuées avec le maximum de garanties techniques. Les germes sélectionnés et substitués sont parfois très proches les uns des autres : *Escherichia* et *Aerobacter*, staphylocoque et tétragène par exemple. Ils ne peuvent être différenciés par les procédés rapides dont on fait trop usage en clinique et nécessitent une identification plus précise.

Il va sans dire que nous avons essayé d'utiliser des techniques aussi simples que possible.

Nous allons étudier tout d'abord :

— La mobilité,
— La morphologie,
— La coloration de Gram,
— La coloration de Ziehl,

qui vont nous permettre de classer les germes dans les différents groupes de notre tableau.

Nous passons ensuite à l'étude successive des différents groupes de germes, en étudiant les milieux de culture et leur préparation, ainsi que l'interprétation des résultats des réactions biochimiques (fermentations de sucres, séro-agglutinations, etc...). Nous passerons sous silence les caractères des cultures en bouillon ordinaire et la forme des colonies sur gélose, ces caractères ne présentant pas de spécificité ni d'intérêt majeur dans le diagnostic bactériologique.

Les milieux et les tests seront étudiés dans l'ordre où ils sont classés sur le tableau. Nous tâchons de ne pas nous répéter et un milieu déjà étudié dans un groupe précédent ne sera que cité.

Nous étudierons, pour terminer, la détermination de la sensibilité microbienne aux antibiotiques et sa technique opératoire. Dans notre travail, il a été pratiqué un test de sensibilité aux antibiotiques pour chaque germe identifié en clinique.

I. — MOBILITÉ.

De nombreuses espèces bactériennes sont mobiles. Cette mobilité ne doit pas être confondue avec les mouvements browniens (oscillations) qui sont propres aux germes immobiles, comme aux particules inertes suspendues dans un fluide.

La vitesse de translation est variable parmi les espèces mobiles. Cette mobilité est due à la présence de cils (suivant le nombre de ces cils, on peut distinguer plusieurs groupes de germes).

La mobilité d'un microbe peut être déterminée en disposant, entre lame et lamelle, une goutte de suspension de germes et en examinant au microscope.

Mais cet examen de la mobilité entre lame et lamelle est parfois douteux. L'immobilité d'un bacille devra être systématiquement vérifiée par une deuxième méthode qui consiste à ensemencer les microbes sur le milieu de TITTSLER et SANDHOLZER qui est une gélose molle.

Préparation du milieu de TITTSLER et SANDHOLZER :

Eau	1.000 cm3
Peptone	20 g
ClNa	5 g
Gélose	5 g

Répartir en culot. Stériliser.

Faire l'ensemencement par piqûre centrale. Les bacilles mobiles diffusent très rapidement à partir de la ligne d'ensemencement en créant un trouble du milieu. Avec les bacilles immobiles, il n'y a pas diffusion et le milieu reste transparent.

II. — MORPHOLOGIE.

Le frottis, après séchage et fixation, est coloré par une solution de bleu de méthylène phéniqué (KÜHNE). Laisser en contact trente secondes, Laver à l'eau. Sécher. Examiner à l'immersion.

Réactif. — Bleu de méthylène phéniqué :

Bleu de méthylène officinal	2 g
Acide phénique cristallisé	2 g
Alcool à 95°	10 cm3
Eau distillée	100 cm3

Broyer dans un mortier la substance colorante. Ajouter l'alcool et l'acide phénique. Triturer. Petit à petit, ajouter les deux tiers de l'eau distillée. Verser dans un flacon. Rincer le mortier avec le dernier tiers de l'eau distillée. Laisser reposer vingt-quatre heures. Filtrer et verser dans un flacon bouché à l'émeri.

III. — COLORATION DE GRAM.

Réactifs nécessaires :

a) Violet de gentiane phéniqué :

Violet de gentiane	1 g
Acide phénique cristallisé	2 g
Alcool à 95°	10 cm3
Eau distillée	100 cm3

Broyer dans un mortier le violet de gentiane. Ajouter l'alcool et l'acide phénique. Triturer. Petit à petit ajouter les deux tiers de l'eau distillée. Verser dans un flacon. Rincer le mortier avec le reste de l'eau distillée. Laisser reposer vingt-quatre heures, filtrer et conserver en flacon bouché à l'émeri.

b) Solution de Lugol :

Iode	1 g
Iodure de potassium	2 g
Eau distillée	200 cm3

Triturer ensemble l'iode et l'iodure, puis ajouter l'eau goutte à goutte.

c) Fuschine diluée :

Diluer dix fois la fuschine phéniquée (voir coloration de Ziehl) pour avoir la fuschine diluée.

Méthode classique. — Sur l'étalement séché et fixé par la chaleur, faire agir successivement en remplaçant deux ou trois fois la solution :

Violet de gentiane phéniqué .... 1 mn environ
Lugol ..... 2 mn environ

Les durées d'action de ces deux solutions ne peuvent être déterminées pour tous les frottis; elles sont en rapport avec les épaisseurs de ces derniers.

Sur la lame égouttée, verser de l'alcool à 95° (ou le mélange alcool à 95°, 5 vol. + acétone, 1 vol.), jusqu'à ce qu'il ne se dissolve plus de violet.

Laver immédiatement à l'eau. Colorer le fond par la fuschine diluée : 30 sec. Laver et sécher. Examiner à l'immersion.

IV. — COLORATION DE ZIEHL.

Réactifs nécessaires :

a) Bleu de méthylène phéniqué.

b) Ziehl (fuschine phéniquée) :

Fuschine basique	1 g
Acide phénique cristallisé	5 g
Alcool à 95°	10 cm³
Eau distillée	100 cm³

Broyer dans un mortier la fuschine basique. Ajouter l'alcool et l'acide phénique, triturer. Petit à petit ajouter les deux tiers de l'eau distillée. Laisser reposer vingt-quatre heures, filtrer et conserver dans un flacon bouché à l'émeri.

Technique. — Sur l'étalement fixé par la chaleur, faire agir à chaud de la fuschine phéniquée de Ziehl pendant 5 mn en maintenant l'émission de vapeurs sans ébullition. Laver à l'eau, puis plonger dans de l'acide nitrique au 1/4 (ou acide sulfurique au 1/5) durant 2 mn. Laver à l'eau, puis passer dans de l'alcool à 95° pendant 5 mn. Laver à l'eau. Colorer le fond par du bleu de méthylène phéniqué pendant 30 sec. Laver à l'eau. Sécher. Examiner à l'immersion.

ISOLEMENT DES GERMES

L'examen microscopique du produit pathologique (pus, crachat, urine, etc...) pourra déceler dans certains cas la présence de deux ou plusieurs germes. Nous devrons, dans un premier temps, les isoler pour pouvoir les identifier. Il faut faire la séparation de ces germes de façon à les obtenir en culture pure.

Pratiquement, c'est sur milieu solide que se fait la séparation. Le principe en est le suivant : ensemencer un minimum de germes et, par une technique appropriée de dissociation de ces germes, obtenir que des unités microbiennes deviennent des colonies séparées, faciles à repérer par leurs caractères particuliers.

Il existe ainsi deux principales techniques d'isolement de la suspension :

— Isolement par épuisement.
— Isolement par dilution.

I. — ISOLEMENT PAR ÉPUISEMENT A LA SURFACE DES MILIEUX SOLIDES.

Prélever à l'aide d'un fil de platine la suspension de germes (l'idéal est de partir avec un minimum de microbes) et faire des stries transversales sur la gélose coulée en boîte de Pétri. On ensemence ainsi trois boîtes sans recharger le fil.

Porter à l'étuve à 37°, boîtes renversées.

II. — DILUTION ET MISE EN CULTURE EN MILIEUX SOLIDES PRÉALABLEMENT LIQUÉFIÉS. MÉTHODE DES DILUTIONS.

Nous utiliserons comme milieu la gélose. (La gélatine peut également être utilisée.)

Faire fondre au bain-marie trois tubes de gélose en culot, chaque tube contenant 10 à 12 cm^3 environ de milieu. Laisser refroidir aux environs de 40°.

A l'aide d'une pipette Pasteur stérile, prélever une certaine quantité de produit pur ou dilué, et porter une goutte dans un premier tube; mélanger soigneusement en inclinant puis en redressant le tube et en le roulant rapidement entre les mains, sans produire de bulles d'air. Avec une nouvelle pipette stérile, porter trois gouttes de ce mélange dans un deuxième tube. Mélanger, puis porter VI gouttes de ce mélange dans un troisième tube. Brasser comme précédemment et couler respectivement ces trois tubes dans trois boîtes de Pétri stériles. Laisser solidifier le milieu. Etiqueter les boîtes; les porter à l'étuve à 37° en les retournant couvercle en-dessous.

Quelle que soit la méthode pratiquée, examiner les boîtes de gélose après un séjour à l'étuve de vingt-quatre heures :

— Dans la boîte n° 1, les colonies sont très nombreuses, presque confluentes. Le prélèvement d'une colonie isolée est impossible.

— Dans la boîte n° 2, les colonies sont moins nombreuses, plus séparées.

— Dans la boîte n° 3, les colonies sont rares, chacune des variétés est nettement isolée et le prélèvement est facile.

On a donc isolé par une de ces méthodes les germes contenus dans le produit pathologique; il devient facile

maintenant, par repiquage des colonies, d'obtenir une culture séparée de chaque germe.

Toutefois, il faut encore, pour être sûr d'avoir une culture pure, faire une purification de la colonie choisie. Il se peut en effet que, parmi de très nombreux germes constituant une colonie microbienne, se trouvent quelques unités de l'autre espèce.

Pour la purification d'une colonie, prendre avec un fil de platine stérile une parcelle de la colonie choisie, la diluer dans quelques cm^3 d'eau physiologique stérile. Partant de cette dilution faire une séparation de germes, comme il vient d'être indiqué.

Exécuter cette technique pour chacun des types de colonies et porter à l'étuve à 37° pendant vingt-quatre heures.

On possède alors des cultures parfaitement pures. Ensemencer chacune des espèces sur un tube de bouillon ordinaire.

Ces cultures pures en bouillon vont servir de matériel pour l'identification précise de chacun des germes.

Nous croyons personnellement que la méthode des dilutions pour l'isolement des germes aérobies donne de moins bons résultats que la méthode par épuisement de la suspension.

En effet, un seul germe comme le staphylocoque ou le colibacille, par exemple, ensemencé dans ces conditions, donne, en gélose coulée en boîte de Pétri, deux types de colonies : les unes fines incluses dans la gélose; les autres plus larges à la surface de la gélose. Ce double aspect du développement d'un germe, suivant que la colonie s'est développée à la surface ou à l'intérieur de la gélose, peut faire croire à l'existence de deux germes, alors qu'il n'en est rien.

Nous utiliserons donc de préférence la méthode d'isolement par épuisement de la suspension.

COCCI GRAM POSITIF

1° Bouillon ordinaire
2° Gélose ordinaire.
3° Gélatine.
fixent la morphologie et le mode de groupement.

Liquéfiée. — *Staphylococcus* (grappe de raisins) [1]. — Milieu de CHAPMAN. Plasma - coagulase. Mannitol.

4° Milieux au sang.

Hémolyse. — *Streptococcus* (chaînettes) [2]. — *α. S. viridans.* *β.* S. hémolytique. S. de caractères variables.

5° Milieux hostiles :
Bouillon
chauffé 60° C, 30 minutes.
hypersalé, 6,5 p. 100 ClNa.
hyperbasique, *p*H = 9,5.
bleu de méthylène, 0,1 p. 100.
Streptococcus fæcalis. — Esculine.

6° Milieu bilié. — Lyse. — *Diplococcus pneumoniæ* (flammes de bougie par paires capsulé) [2]. — Capsulé sur milieux organiques. Inuline. Phénomène de NEUFELD : — Gonflement de la capsule. — Lyse en bouillon. Inoculation à trois souris blanches.

7° Sérum de Lapin. — Tétrade capsulée. — *Gaffkya tetragena* [1]. — Pomme de terre.
Diplococcus crassus [3]. — Diplocoques Gram positif et négatif.

COCCI ET FORMES AFFINES GRAM NÉGATIF

1° Bouillon ordinaire.
2° Gélose ordinaire.
3° Bouillon - Ascite - CO_2.
4° Gélose - Ascite - CO_2.
5° Dégagement de H_2S :
Gélose au plomb.
Papier au sous-acétate de plomb.

A. Développement sur milieux enrichis (ascite) en atmosphère de CO_2. — *Neisseria* [3] *intracellularis* / *gonorrhoeæ* — Réactions sucrées : — Glucose. — Levulose. — Maltose. Test de MAC LEOD.

B. Développement : gélose. bouillon.
H_2S — *Autres Neisseriacées* [3]. — Réactions sur les mêmes milieux sucrés que les précédentes.
H_2S + *Brucellæ* [4]. pour mémoire.

COCCOBACILLES GRAM NÉGATIF EN NAVETTE

1° Bouillon ordinaire (2 tubes).
2° Gélose ordinaire.
3° Bouillon cystéiné glucosé + sérum.
4° Milieu au sang.

A. Ne pousse que sur : milieu au sang. — *Hemophilus* [5].

B. Ne pousse que sur : milieu au sang. bouillon cystéiné glucosé + sérum. — *Pasteurella tularensis* [6]. — Inoculation au cobaye.

C. Pousse sur : bouillon. gélose. milieu au sang. bouillon cystéiné glucosé + sérum. — *Pasteurella.* *Pestis* (θ = 28°). Pseudo *tuberculosis*. Autres *Pasteurellæ* [7]. — Réactions sucrées : — Saccharose. — Rhamnose.

Pour tous les renseignements complémentaires, se reporter à « Pratique du Laboratoire », de Ch. JAULMÈS, A. JUDE et J. QUÉRENDAL DES ESSARTS, aux pages indiquées :

(1) Voir page 119;
(2) Voir pages 121, 122, 123;
(3) Voir page 146;
(4) Voir page 187;
(5) Voir pages 128, 155, 215;
(6) Voir page 126;
(7) Voir page 125;
(8) Voir page 181;
(9) Voir page 208;
(10) Voir pages 165, 166;
(11) Voir pages 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175;
(12) Voir pages 165, 166, 176, 177;
(13) Voir page 130;
(14) Voir pages 142, 144;
(15) Voir page 152.

BACILLES GRAM NÉGATIF MOBILES

1° Bouillon ordinaire.
2° Gélose ordinaire.
3° Gélose lactosée, tournesolée.
4° Dégagement H_2S.

A. Coloration bipolaire. — *Malleomyces* pseudo-*Mallei.* — Voile sur milieux liquides. Fermente tous les sucres. Inoculation au cobaye mâle.

B. Bacille virgule. — *Vibrio* [8] *comma.* / *El Tör.* / autres. — Choléra - roth. Réactions sucrées. Milieux alcalins. Séro-agglutination. Pouvoir hémolytique de El Tör.

Lactose positif. — *Coliformes* [9]. — Test I. M. V. IC.

Test I. M. V. IC.
2 Milieux de CLARK et LUBS. — *Escherichia coli* I et II. — Indol - H_2S.
1 Milieu de SIMMONS. — *Escherichia freundii I et II.* — Indol - H_2S.
1 Milieu de TITTSLER. — *Aerobacter aerogenes.* / *Aerobacter cloacae.* — Gélatine - Glycérine.

Lactose négatif [10].

Milieu de HAJNA. Milieu de KENDALL. Milieu de TITTSLER. Milieu de SIMMONS. Sérum coagulé. — Ces différents milieux permettent un diagnostic de présomption.
Fæcalis alcaligenes. — Petit lait : bleu.
Proteus. — Sérum coagulé liquéfié.
Salmonellae [11] — Indol - Milieu de FERGUSSON.
Pseudomonas aeruginosa. — Séro-agglutination. Pigments : chloroforme. Gélatine liquéfiée.

BACILLES GRAM NÉGATIF IMMOBILES

1° Bouillon ordinaire.
2° Gélose ordinaire.
3° Milieu de TITTSLER.
4° Gélose au sang.
5° Gélose lactosée, tournesolée.
6° Gélose glycérinée (5 p. 100), fuschinée.
7° Gélose glycérinée (5 p. 100), CO_2.
8° Dégagement H_2S.

Moraxella lacunata. — Ne pousse que sur milieu au sang.
Malleomyces mallei. — Pousse bien sur gélose glycérinée (5 p. 100). Inoculation au cobaye + fuschine.

Lactose positif. — *Klebsiella* [9] *pneumonia.* / *ozenae.* — Maltose. Test I. M. V. IC. Milieu au sang : capsulé.
Shigella sonnei - Sh. dispar.

Lactose négatif.
H_2S — *Shigellae* [12]. — HAJNA. KENDALL. TITTSLER.
H_2S + *Brucellae* [4] *melitensis.* / *bovis.* / *suis* — Mouvements browniens très nets. Ne font fermenter aucun sucre. Epreuves de HUDDLESON.

BACILLES GRAM POSITIF MOBILES

Différenciation morphologique importante.

1° Bouillon ordinaire.
2° Gélose ordinaire.
3° Milieu de TITTSLER.
4° Coloration de MOELLER.

A. Présence de spores. — *Bacillus subtilis.* (3-4 μ × 1 μ) — Pour mémoire (non-pathogène).

B. Absence de spores. — *Listeria monocytogenes* [13]. (1 μ × 0,5 μ) — Séro-agglutination.

BACILLES GRAM POSITIF IMMOBILES

ZIEHL NÉGATIF

A. Pratique du ZIEHL systématique.
B. 1° Bouillon ordinaire.
2° Gélose ordinaire.
3° Milieu de TITTSLER.
4° Sérum coagulé.
5° Gélose lactosée tournesolée.
6° Coloration de MOELLER.

A. Présence de spores. — *Bacillus anthracis.* (5 μ × 1 μ) — Gélatine liquéfiée.

B. Absence de spores.
Lactose positif. — *Erysipelotrix rhusiopathiae* [13]. (1 μ × 0,2 μ) — Séro-agglutination.
Lactose négatif. — *Corynebacterium* [14]. — Caractères morphologiques et tinctoriaux.

ZIEHL POSITIF

Mycobacteriaceae.
Penser à la possibilité de la présence du bacille du smegma et des robinets.
Mycobacterium tuberculosis [15]. Milieu de LOWENSTEIN - DUBOS. Inoculation au cobaye.
Mycobacterium leprae (globies). Culture et inoculation négatives.

GROUPE N° 1

ÉTUDE DES GERMES EN FORME DE COCCI GRAM POSITIF

L'ensemencement se fera systématiquement sur tous les milieux se trouvant à la gauche de notre tableau :

- Bouillon ordinaire;
- Gélose ordinaire;
- Gélatine;
- Milieu au sang;
- Milieux hostiles;
- Milieu bilié.

Nous allons étudier tout d'abord deux milieux : le bouillon ordinaire et la gélose ordinaire que nous utiliserons constamment, pour tous les groupes de germes.

Bouillon ordinaire :

Préparation. — Au lieu d'utiliser la méthode classique, qui consiste à préparer le bouillon ordinaire à partir de la viande maigre de bœuf, nous utiliserons un procédé beaucoup plus rapide en partant d'un extrait de viande. Nous avons utilisé l'extrait Liebig.

Peptone	20 g
Eau	975 cm3
Extrait de viande Liebig	25 cm3
Sel marin	10 g
Phosphate disodique	une pincée

Faire dissoudre au bain-marie à 80-90°.

2° Ajuster le milieu au *p*H désiré (7,4 à 7,8 selon la destination du milieu de culture). Il est bon de dépasser de 0,2 ou 0,4 le *p*H

final désiré; souvent la stérilisation diminue le *p*H de cette valeur

3° Porter à l'autoclave à 115-117° pendant cinq minutes; les phosphates alcalino-terreux précipitent et produisent un trouble.

4° Filtrer à chaud sur filtre mouillé. Le liquide obtenu est ramené au volume de 1.000 cm3 par addition d'eau distillée.

5° Le liquide limpide est réparti dans des tubes ou des ballons. On verse 10 à 15 cm3 par tube et 250 cm3 par ballon.

6° Les tubes, bouchés au coton cardé, sont portés à l'autoclave à une température de 110 à 115° pour stériliser le milieu (les tubes sont placés dans un panier métallique). Cette température doit être maintenue vingt minutes, mais ne doit pas être dépassée. En effet, si l'on dépassait la température de la première chauffe, le bouillon serait troublé par une nouvelle précipitation de phosphates.

Gélose ordinaire :

Préparation :

1° Partir du bouillon de viande à *p*H non ajusté;

2° Ajouter 20 g d'agar-agar préalablement macéré pendant quelques heures dans de l'eau et exprimé;

3° Ajuster le *p*H du milieu;

4° Laisser refroidir et « coller » la gélose en y ajoutant par petites quantités un blanc d'œuf préalablement battu dans 50 cm3 d'eau et en ayant soin de bien mélanger dans le milieu; sous l'action de la chaleur le blanc d'œuf coagule et entraîne le précipité des sels contenu dans le milieu;

5° Chauffer à 115° pendant trente minutes; filtrer sur papier Chardin préalablement mouillé;

6° Répartir en tubes;

7° Stériliser à 110° pendant vingt minutes.

Remarque. — La gélose filtre bien en prenant les précautions suivantes :

— L'entonnoir garni de son filtre est disposé dans le goulot du ballon après avoir placé entre les deux un crochet de fil de fer pour ménager une sortie d'air;

— Mettre le tout dans l'autoclave;

— Verser la gélose sur le filtre, couvrir avec une compresse;

— Poser le couvercle de l'autoclave sans écrous, robinet ouvert chauffer doucement.

La gélose sera le milieu le plus couramment utilisé pour la séparation des germes et l'obtention de cultures pures.

Nota. — Ajustage du *p*H des milieux de culture : pratiqué par méthode colorimétrique.

L'indicateur colorimétrique utilisé est le bleu de bromothymol (dibromothymolsulfonéphtaléine) en solution à 0,04 p. 100,

Etude des milieux de culture permettant d'établir un diagnostic de présomption.

Gélatine :

Préparation. — Opérer de la même façon que pour le bouillon.

Eau ordinaire	975 cm³
Peptone	30 g
Sel marin	10 g
Phosphate disodique	une pincée

Faire dissoudre au bain-marie à une température de 80 à 90°.

Ajouter : gélatine fragmentée : 100 à 130 g.

Suivant la saison, il faut faire varier la quantité de gélatine : En hiver, une gelée à 10 p. 100 suffit; en été, il faut atteindre 10 à 12 p. 100.

Faire fondre au bain-marie, sans dépasser 60°, pour dissoudre la gélatine, puis ajuster le milieu quand elle est complètement fondue. Refroidir le milieu à 55°, et le coller en ajoutant par petites portions un blanc d'œuf battu dans 50 cm³ d'eau que l'on mélange avec un agitateur dans toute la masse du liquide.

Chauffer à 115° pendant quinze minutes pour précipiter les phosphates alcalino-terreux.

Filtrer le bouillon gélatiné sur papier Chardin préalablement mouillé; la filtration est rapide et le filtrat teinté en jaune est limpide.

Répartir en tubes à essais. Boucher au coton cardé.

Stériliser à 110° pendant vingt minutes.

Après la stérilisation, les tubes sont maintenus droits dans un panier grillagé jusqu'à leur consolidation.

Les tubes sont capuchonnés, le lendemain de leur préparation, pour éviter la dessication du milieu.

Précautions à prendre au cours de la technique :

1° Si le milieu passe trouble à travers le filtre Chardin, refroidir la gélatine à 55° et la coller à nouveau avec un blanc d'œuf. Précipiter à 112-113° et filtrer à nouveau.

2° Si la gélatine ne se solidifie pas, c'est que le milieu a été trop alcalinisé et la gélatine transformée en gélatose.

3° Si la gélatine filtre mal, c'est qu'elle est acide (tous les milieux liquides acides passent difficilement à travers les filtres).

La gélatine est trouble quand la température de stérilisation est supérieure à la température de précipitation,

La gélatine est surtout employée en « culot ». L'ensemencement se fait par piqûre centrale. Le staphylocoque entraîne la liquéfaction consécutive à une peptonisation due à des diastases du germe. Cette liquéfaction est progressive, en entonnoir. Elle débute vers le troisième ou quatrième jour. Cette liquéfaction est surtout accentuée avec le staphylocoque doré.

Comme la gélatine se liquéfie au-dessus de 22°, elle ne doit pas être mise à l'étuve à 37°, mais laissée à la température du laboratoire.

Gélose au sang :

Préparation : faire fondre la gélose; la laisser refroidir à 45°; et, dans chaque tube, ajouter 1 cm³ de sang prélevé aseptiquement, pour 10 cm³ de milieu.

Mélanger, incliner, laisser refroidir.

L'hémoglobine stérilisée par filtration peut être substituée au sang.

L'hémolyse ou la décoloration du milieu établit un diagnostic de présomption en faveur du streptocoque pathogène.

Les *streptocoques* donnent des colonies épaisses, luxuriantes. Le streptocoque hémolytique décolore la périphérie des colonies. Le streptocoque viridans donne une teinte verte à la périphérie des colonies.

Milieux hostiles :

Ces milieux sont au nombre de quatre :

1° Bouillon ordinaire hypersalé par addition de 6,5 g p. 100 de ClNa.

2° Bouillon ordinaire hyperbasique ayant un *p*H égal à 9,6.

3° Bouillon ordinaire additionné de 0,1 p. 100 de bleu de méthylène.

4° Bouillon ordinaire chauffé à 60° pendant trente minutes après l'ensemencement.

Une culture positive établit un diagnostic de présomption en faveur du *Streptococcus faecalis*.

Bouillon bilié :

Milieu contenant 10 p. 100 de bile.

La vésicule biliaire est laissée suspendue à une potence pendant quelques heures pour que la bile décante. La vésicule est percée et vidée aseptiquement au niveau du tiers inférieur, de façon à ne pas entraîner le dépôt qui a pu se former. Laisser à nouveau reposer la bile à la glacière. Décanter. Filtrer sur ouate hydrophile. Répartir la bile en tubes ou en ampoules qu'on stérilise à 115°.

A 1 à 2 cm³ de culture en bouillon du germe à identifier, on additionne 1/10 à 2/10 de cm³ de bile. Le mélange, qui est trouble, s'éclaircit en quelques instants. Au microscope, on ne retrouve plus de microbes.

Les *Diplococcus pneumoniæ* sont lysés par la bile.

Etude des tests biochimiques, du pouvoir pathogène et des milieux permettant d'établir un diagnostic de confirmation.

Staphylococcus

Milieu de Chapman. — Milieu hypertonique qui permet l'isolement du staphylocoque pathogène.

Extrait de viande de bœuf	1 g
Protéose peptone Difco	10 g
Mannite	10 g
Gélose en poudre	15 g
ClNa	75 g
Rouge de phénol	0,025 g

Dissoudre en chauffant dans un litre d'eau distillée.

Amener à *p*H = 7,4. Répartir en tubes à essais.

Stériliser en vapeurs fluentes deux ou trois fois à une heure d'intervalle.

Faire fondre le contenu du tube au bain-marie au moment de l'emploi. Faire évaporer l'eau de condensation à l'étuve et ensemencer avec une dilution du prélèvement.

Faire fondre le contenu d'un tube au bain-marie au moment de l'emploi. Sécher la surface et ensemencer avec une dilution du prélèvement.

Les staphylocoques pathogènes donnent des colonies jaunes entourées d'une auréole jaune, tandis que les staphylocoques non pathogènes donnent des petites colonies rouges sans auréole.

Mannitol. — Polyalcool qui fermente sous l'influence du staphylocoque pathogène. Il est transformé en l'aldose correspondant qui est le lévulose. Le lévulose est ensuite attaqué avec production d'acide. Il n'y a pas dégagement gazeux, la fermentation alcoolique avec libération de CO_2 n'intervenant pas.

La réaction se pratique comme les réactions sucrées en général.

Remarque. — Un grand nombre de germes possèdent la propriété d'attaquer les sucres avec production d'acides.

Deux procédés peuvent être pratiqués pour étudier la réaction :

1° Le sucre est incorporé, dans la proportion de 2 p. 100, à la gélose après collage au blanc d'œuf. Filtrer à chaud, répartir en tubes, stériliser à 110° pendant vingt minutes.

On peut également utiliser des solutions sucrées à 30 p. 100 que l'on répartit dans des tubes de gélose, au moment de l'emploi, à raison de 1 cm³ pour 10 à 15 cm³ de milieu.

Le virage est indiqué à l'aide d'un indicateur : la teinture de tournesol est incorporée à la dose de 25 cm³ p. 1.000 à la gélose avant de la répartir en tubes ou en boîtes de Pétri.

Porter à l'étuve à 37° pendant vingt-quatre heures.

La teinte vire au rouge si le test est positif.

2° Incorporer le sucre à de l'eau peptonée ordinaire dans les proportions de 2 p. 100.

Après un séjour à l'étuve à 37° pendant vingt-quatre heures, ajouter une à deux gouttes de réactif d'Andrade.

Il apparaît une belle coloration rouge si la réaction est positive.

Préparation de l'*eau peptonée ordinaire :*

Dans un litre d'eau chauffée à 80°, faire dissoudre :

Peptone	20 g
ClNa	5 g

Ajuster à un *p*H de 7,3 à 7,4 s'il y a lieu.

Chauffer à l'autoclave à 120° pendant cinq minutes pour précipiter les sels alcalino-terreux.

Filtrer sur papier Laurent mouillé et répartir dans les tubes à essais. Stériliser à 115° pendant vingt minutes.

Préparation du *réactif d'Andrade :*

Fuschine acide : solution aqueuse à 0,5 p. 100	100 cm³
NaOH normale	16 cm³

Stériliser quinze minutes à 115°.

Cette solution est très légèrement rosée.

Plasmacoagulase. — Les staphylocoques pathogènes ont la propriété de coaguler le plasma humain.

Sur lame : mélanger sur une lame une goutte de plasma frais et une goutte de culture de vingt-quatre heures. Attendre dix minutes.

En tube : mettre dans un tube 0,5 cm3 de plasma humain oxalaté ou citraté, frais, dilué au 1/5. Ajouter 0,5 cm3 de culture en bouillon de vingt-quatre heures. Placer à l'étuve à 37°. Observer après trente minutes, une heure, deux heures, vingt-quatre heures.

Dans l'un et l'autre cas, on observe une coagulation si le staphylocoque est pathogène (cette coagulation est inhibée par la streptomycine).

Streptococcus.

L'hémolyse constatée sur les milieux au sang suffit pour étiqueter les cocci Gram positif disposés en chaînette comme des streptocoques pathogènes.

Le streptocoque hémolytique donne un halo clair autour de la colonie.

Le streptocoque viridans donne un halo vert.

Streptococcus faecalis.

Esculine. — Incorporer à la gélose pour un litre de milieu :

Citrate de fer ammoniacal	2 g
Esculine	1 g

En cas de réaction positive le milieu noircit.

Diplococcus pneumoniae.

Coloration des capsules. – Ces germes ont la propriété d'être capsulés sur les milieux organiques.

Première méthode :

Fixer le frottis par la chaleur et l'alcool absolu.

Colorer pendant une à deux minutes avec le violet de gentiane phéniqué.

Décolorer pendant quelques secondes avec l'alcool-acétone au tiers.

Laver et recolorer rapidement par une solution d'éosine (éosine : 0,50 g, alcool à 95° : 100 cm3).

Les germes sont colorés en violet; les capsules en rose.

Réactifs : violet de gentiane phéniqué (voir coloration de Gram).

Deuxième méthode :

Procédé à l'encre de Chine. — Ce procédé donne lui aussi de bons résultats.

Déposer sur une lame une petite goutte d'encre de Chine pour bactériologie. Y ajouter, en mélangeant soigneusement, une gouttelette de produit à examiner. Etaler le mélange comme pour réaliser un frottis sanguin. Laisser sécher.

Sur un fond sombre les capsules se détachent en clair.

Inuline (milieu de Hiss) :

Sérum de bœuf	1 vol.
Eau distillée	2 vol.

Ajouter 1 p. 100 de teinture de tournesol à 5 p. 100. Chauffer à 100°. Filtrer. Ajouter 1 p. 100 d'inuline. Stériliser par chauffage discontinu à 100°.

Le pneumocoque fermente l'inuline. Le milieu rougit et se coagule. Cette coagulation différencie le pneumocoque des streptocoques. Toutefois, Pochon signale que certaines races de pneumocoques ne fermentent pas l'inuline.

Phénomène de Neufeld :

a) *Lyse en bouillon.* — L'addition de 1/10 de cm3 de bile à 1 à 2 cm3 de culture de pneumocoque provoque une bactériolyse totale.

Le mélange s'éclaircit en quelques instants.

Au microscope, on ne retrouve plus de germes.

b) *Gonflement de la capsule.* — Il existe plusieurs types de germes agglutinables.

L'épreuve de Neufeld consiste à mettre en contact le pneumocoque (dans le produit pathologique) avec les différents antisérums expérimentaux.

Dans le cas de correspondance, on observe très rapidement un « gonflement de la capsule ».

La recherche est rendue plus rapide par l'emploi de mélanges de sérums de plusieurs types.

Prendre avec l'ose une parcelle du produit pathologique à examiner, la déposer sur une lame.

Ajouter une grosse goutte d'un des mélanges de sérums et une goutte de bleu de Loefler (trois parties de solution alcoolique concentrée de bleu de méthylène, pour dix parties d'une solution aqueuse, fraîche, de potasse à 1/10.000).

Mélanger, puis recouvrir d'une lamelle.

Examiner à l'immersion et rechercher les diplocoques bleu foncé entourés d'un halo incolore; si le mélange contient le sérum homologue correspondant, on observe, en quelques secondes, l'apparition d'un halo clair et nettement bordé entourant les diplocoques. Dans le cas contraire, il n'apparaît aucune modification.

Pouvoir pathogène.

Inoculation à trois souris blanches (deux inoculations intrapéritonéales, une inoculation à la base de la queue).

La souris blanche est un animal particulièrement sensible, constituant un moyen idéal d'isolement du germe.

1° L'examen du liquide péritonéal, six heures après l'inoculation, montre la prolifération de pneumocoques.

2° L'examen du liquide péritonéal, chez la deuxième souris, douze heures après l'inoculation, montre une culture pure de pneumocoques.

3° La souris inoculée à la base de la queue meurt de septicémie au bout de vingt-quatre à quarante-huit heures.

Une coloration de frottis montre que les germes sont capsulés.

(Inoculer à chaque souris quelques dixièmes de cm^3 de culture.)

Gaffkya tetragena.

Sérum de lapin. — Prélever le sang aseptiquement, le centrifuger après coagulation du caillot, recueillir le sérum que l'on répartit dans des tubes stériles. Les incliner dans l'étuve à coaguler. Opérer la coagulation lentement à une température de 70°. Laisser refroidir. Tyndalliser de la sorte trois jours de suite. Les tubes doivent être capuchonnés.

Les tétragènes cultivés sur ce milieu sont *capsulés.*

Pomme de terre. — Culture blanche.

Préparation du milieu. — Voir diagnostic de confirmation du staphylocoque.

GROUPE N° 2

ÉTUDE DES COCCI GRAM NÉGATIF ET FORMES AFFINES.

L'ensemencement se fera systématiquement sur tous les milieux se trouvant à la gauche de notre tableau :

— Bouillon ordinaire;
— Gélose ordinaire;
— Gélose-ascite-CO_2;
— Bouillon-ascite-CO_2.
— Rechercher systématiquement s'il y a production de H_2S.

Etude des milieux permettant d'établir un diagnostic de présomption.

Bouillon ordinaire.

(Voir groupe n° 1).

Gélose ordinaire.

(Voir groupe n° 1).

Gélose-Ascite-CO_2.

Le méningocoque et le gonocoque ont la propriété de ne pousser que sur des milieux enrichis. La culture est favorisée par une atmosphère contenant 10 p. 100 de CO_2.

Préparation de la gélose-ascite : faire fondre de la gélose au bain-marie bouillant. Après liquéfaction complète, laisser refroidir vers 45°. Ajouter alors l'ascite dans la proportion de un pour trois. Répartir en tubes ou en boîtes de Pétri stériles. Laisser refroidir les tubes en position inclinée.

Pour obtenir une atmosphère contenant 10 p. 100 de CO_2, mettre les tubes ou les boîtes de Pétri ensemencés dans un bocal. Placer dans ce bocal une bougie allumée. Fermer le bocal hermétiquement. La bougie s'éteint et l'atmosphère contient environ 10 p. 100 de CO_2.

Bouillon-Ascite-CO_2.

Ajouter au bouillon de l'ascite dans les mêmes proportions que pour la gélose-ascite. Mettre en atmosphère de CO_2 comme précédemment.

Production de H_2S.

Deux procédés :

a) Gélose au sous-acétate de plomb;

b) Papier au sous-acétate de plomb.

Préparation de la gélose au sous-acétate de plomb : employer des culots de gélose ordinaire (5 à 6 cm3 par tube à essais). Au moment de l'emploi, liquéfier ces culots au bain-marie et ajouter II gouttes de solution stérile suivante :

Sous-acétate de plomb liquide du Codex ...	1 cm3
Eau distillée	9 cm3

Mélanger en roulant le tube entre les deux mains, et refroidir sous un courant d'eau froide.

Ensemencer la culture sur le milieu par plusieurs piqûres profondes en introduisant le fil de platine le long des parois du tube. S'il y a production d'H_2S, la gélose prend une teinte plus ou moins marquée et d'apparition plus ou moins précoce.

Papier réactif au sous-acétate de plomb : des rubans de papier filtre sont placés dans un récipient contenant une solution saturée de sous-acétate de plomb dont ils s'imprègnent. Les laisser sécher à l'obscurité. Ils doivent être conservés à l'abri de la lumière après autoclavage.

Ensemencer le germe sur un milieu en tube incliné; le papier réactif, maintenu par le bouchon de coton, est placé à l'intérieur du tube.

Le papier noircit à l'extrémité inférieure si le test est positif.

Etude des milieux, des tests biochimiques, permettant un diagnostic de confirmation.

Neisseria intracellularis. — Neisseria gonorrhoeae.

Réactions sucrées : glucose, lévulose, maltose.

Opérer pour chacun de ces sucres, selon le procédé général décrit plus haut :

Gélose — ascite — (sucre) tournesolée — CO_2.

Eau peptonée — ascite (sucre) — CO_2.

Il est préférable d'utiliser le milieu liquide car *Neisseria intracellularis* repart mieux que sur milieu solide.

Test de Mac Leod. — Ce test permet d'identifier *Neisseria gonorrhoae.*

La surface d'une gélose au sang, qui a servi de milieu de culture, est recouverte d'une solution aqueuse à 1 p. 100 de tétraméthyl-para-phénylène-diamine. Les colonies de gonocoques acquièrent une teinte rouge virant ultérieurement au brun, puis au noir.

Autres neisseriacées.

Pratiquer les mêmes réactions sucrées sur milieu ne contenant pas d'ascite; et en atmosphère ordinaire.

Brucella melitensis, bovis, suis.

Les *Brucellae* sont des bacilles courts pouvant revêtir parfois l'aspect cocciforme.

La production de H_2S établit un diagnostic de présomption en faveur de ces germes.

Cependant, certaines souches de *Brucella melitensis* ne donnent pas d'H_2S.

Diagnostic différentiel des *Brucellae* par les épreuves de Huddleson (voir groupe n° 5).

GROUPE N° 3

ÉTUDE DES COCCOBACILLES GRAM NÉGATIF EN NAVETTE.

L'ensemencement se fera systématiquement sur tous les milieux se trouvant à la gauche de notre tableau :

— Bouillon ordinaire (deux tubes);
— Gélose ordinaire;
— Gélose sérum-cystine-glucose;
— Gélose au sang.

Bouillon ordinaire :

(Voir groupe n° 1.)

Gélose ordinaire :

(Voir groupe n° 1.)

Gélose sérum-cystine-glucose :

La composition du milieu est la suivante :

Bouillon de bœuf	1.000 cm³
Gélose	15 g
Peptone	10 g
ClNa	5 g

Faire dissoudre les différents composants. Ajuster au *p*H 7,8 Stériliser. Le *p*H final doit être de 7,3-7,4.

Avant l'emploi on ajoute :

Cystine (à défaut HC_1 de cystine)	1 g
Sérum de lapin	50 cm³
Glucose	10 g

Gélose au sang :

Prélever le sang aseptiquement.

Faire fondre la gélose. La laisser refroidir à 45°. Dans chaque tube ajouter 1 cm³ de sang pur pour 10 cm³ de gélose. Mélanger. incliner, laisser refroidir,

L'hémoglobine stérilisée par filtration peut être substituée au sang.

Remarque. — Le *Pasteurella pestis* a la propriété de pousser plus rapidement à une température de 28°-30°. Aussi, nous ensemençons deux tubes de bouillon ordinaire.

Un sera laissé à la température du laboratoire; l'autre sera placé à l'étuve à 37°.

ETUDE DES TESTS BIOCHIMIQUES, DU POUVOIR PATHOGÈNE PERMETTANT D'ÉTABLIR UN DIAGNOSTIC DE CONFIRMATION.

Pasteurella tularensis

Inoculation au cobaye. — L'inoculation se pratique par voie intrapéritonéale. Le germe pullule dans le sang et, suivant sa virulence, il provoque la mort en quelques jours ou en quelques semaines.

Réactions sucrées. — Saccharose, rhamnose.

Se pratique comme les réactions sucrées en général.

GROUPE N° 4

ÉTUDE DES BACILLES GRAM NÉGATIF MOBILES

L'ensemencement se fera systématiquement sur tous les milieux se trouvant à la gauche de notre tableau :

— Bouillon ordinaire;
— Gélose ordinaire;
— Gélose lactosée tournesolée;
— Rechercher le dégagement de H_2S.

Etude des milieux permettant d'établir un diagnostic de présomption.

Bouillon ordinaire :

(Voir groupe n° 1.)

Gélose ordinaire :

(Voir groupe n° 1.)

Gélose lactosée tournesolée :

Lactose . ..... 2 p. 100
Teinture de tournesol ..... 2,5 p 100

Se prépare comme une gélose (sucre).

Production de H_2S :

(Voir groupe n° 2.)

Etude des milieux, des tests biochimiques et sérologiques, du pouvoir pathogène permettant un diagnostic de confirmation.

Malleomyces pseudomallei.

Inoculation au cobaye mâle. — Après inoculation intrapéritonéale, il se constitue une orchite suppurée et dès le deuxième jour apparaît un gonflement scrotal. La mort survient en cinq ou six jours.

Vibrio comma, El-Tor et autres.

Choléra-Roth : (R) Indolnitreux. — Le vibrion cholérique, en culture sur milieu peptoné, donne de l'indol aux dépens de la peptone et transforme les nitrates en nitrites. Ce caractère est fondamental; tandis que les autres microbes producteurs d'indol, tels que le colibacille, ne donnent la réaction qu'après addition de nitrite, au contraire le vibrion cholérique produit simultanément indol et nitrite. La réaction s'obtient donc par addition d'acide sulfurique.

Cette réaction se pratique de la façon suivante :

Ensemencer la culture suspecte dans le milieu suivant :

Peptone de Witte	10 g
Nitrate de potassium	1 g
Chlorure de sodium	3 g
Eau distillée	1.000 cm³

Après vingt-quatre heures d'étuve à 37°, ajouter 1 à 2 cm³ de SO_4H_2 ou de HCl pur.

En cas de réaction positive, il se développe une coloration rouge.

Milieux alcalins. — Le vibrion cholérique a la propriété de cultiver très rapidement en eau peptonée alcaline à *p*H 8, que l'on porte à l'étuve à 37° pendant trois heures après l'ensemencement. Deux milieux peuvent être utilisés :

1° *Milieu de Dieudonné :*

Prendre du sang défibriné de bœuf. Le mélanger à parties

égales avec de la solution normale de potasse (56 g par litre) dans un ballon stérile. Porter le mélange à 100° pendant trente à quarante-cinq minutes, ou vingt minutes à 120°.

A sept parties de gélose neutre à 3 p. 100 stérile, ajouter aseptiquement trois parties de mélange sang-potasse. Couler en boîte de Pétri. Porter les boîtes soit à l'étuve pendant vingt-quatre heures, soit à 60° pendant cinq minutes, soit pendant quarante-huit heures à la température du laboratoire, couvercle entrouvert. Cette technique a pour but d'éliminer une partie de l'ammoniaque qui s'est formé par action de la potasse sur le sang. Le milieu n'est pas utilisable immédiatement car il est trop alcalin. Il faut attendre quarante-huit heures, mais à ce moment-là il risque de ne plus l'être assez.

Ensemencer le milieu coulé en boîte de Pétri, en faisant des stries avec l'ose chargée de culture à vérifier. Mettre à l'étuve à 37°. Au bout de sept à huit heures, on voit se développer le long des stries et sur les bords, de fines colonies transparentes qui partent sous forme de rayons. Le vibrion, grâce à sa mobilité, a fusé à partir de la strie d'ensemencement.

A partir de ces colonies, on pratique la réaction du choléra-roth; et pour terminer l'identification, on pratique une séro-agglutination.

Le milieu de Dieudonné a l'inconvénient d'avoir un *p*H qui varie trop rapidement. Nous préférons le milieu suivant qui donne de meilleurs résultats :

2° *Milieu de Lefebvre et Gallut :*

a) Gélose ordinaire à 3 p. 100 stérilisée à 120°. Après filtration, ajouter 40 cm³ de soude normale pour un litre de gélose. Filtrer sur coton, puis répartir en tubes (tubes de Legroux), à raison de 14 cm³ par tube.

Stériliser à 115°.

b) Hémoglobine cristallisée, pulvérisée ...	10	g
Eau distillée	90	cm³
NaOH 10 p. 100	10	cm³

Dissoudre en portant au bain-marie quarante-cinq minutes jusqu'à obtention d'une solution claire, ne contenant pas de grumeaux.

c) La solution tampon est constituée par du glycocolle et du ClNa :

Solution A :

ClNa	5,650 g
Glycocolle	5,505 g
Eau distillée	1.000 cm³

Solution B :

NaOH N/10.

On obtient la solution tampon en mélangeant :

— Solution A : 8 cm³.

— Solution B : 2 cm³.

L'hémoglobine tamponnée est obtenue en mélangeant :

Solution d'hémoglobine	10 cm³
Solution tampon	27,5 cm³

Stériliser à l'autoclave à 120° pendant vingt minutes.

Pour la préparation du milieu, faire fondre la gélose répartie en tubes et ajouter 6 cm³ d'hémoglobine tamponnée aux 14 cm³ de gélose contenus dans les tubes.

Mettre les tubes pendant vingt-quatre heures à l'étuve à 37°. Les retirer ensuite et les capuchonner. Ils sont alors prêts à l'emploi et peuvent être conservés pendant plusieurs mois.

Ce milieu peut se conserver au laboratoire et ainsi ne présente pas les inconvénients du milieu de Dieudonné. L'ensemencement peut être fait directement, en partant de la selle suspecte. A partir des colonies nous pratiquons une réaction de choléra-roth; et nous pratiquerons une séro-agglutination pour terminer l'identification.

Séro-agglutination. — Si l'antigène H ne possède aucun caractère de spécificité, l'antigène O permet de classer tous les vibrions en six groupes. Les vibrions pathogènes appartiennent au groupe O1, caractérisé par cinq facteurs antigéniques.

Une agglutination positive supérieure au 1/1.000, permet d'identifier comme pathogène le vibrion, et d'éliminer tous les autres vibrions, à l'exception toutefois d'*El-Tor* qui est également agglutiné (confirmé par l'épreuve de Gipsen).

Pouvoir hémolytique. — Le vibrion *El-Tor* possède un pouvoir hémolytique marqué.

Bacilles Gram négatif mobiles lactose positif : coliformes.

Pratiquer systématiquement le « *Test d'I.M.V.IC.* ».

Nous insisterons davantage sur ce test car nous l'avons très souvent utilisé dans notre travail sur les flores microbiennes de l'arbre urinaire.

Actuellement, on ne retient que quatre épreuves pour différencier les coliformes; on ensemencera sur :

1° Eau peptonée : pour rechercher l'indole.
2° Milieu de Clark et Lubs : épreuve du rouge de méthyle.
3° Milieu de Clark et Lubs : recherche de l'acétyl-méthyl-carbinol.
4° Milieu de Koser-Simmons : culture sur citrate de soude comme seule source de carbone.

Ces quatre tests sont résumés dans le vocable mnémotechnique : I.M.V.IC.
I = indole, M = rouge de méthyle, V = (r) Voges-Proskauer, IC = citrate de soude.

Etude des tests.

Indole. — Un certain nombre de coliformes ont la propriété de transformer le tryptophane en acide indole-carbolique, qui sous l'influence de la carboxylase donne naissance à l'indole. Les germes non indologènes arrêtent leur action au stade acide indole-carbolique, qui est le composé chimique intermédiaire entre le tryptophane et l'indole.

Technique : culture en eau peptonée, étuve à 37° pendant quarante-huit heures.
La mise en évidence de l'indole peut être faite à l'aide de plusieurs réactions, mais nous n'en retiendrons qu'une seule qui est particulièrement sensible et qui ne nécessite qu'une seule manipulation. Il s'agit de la *réaction de Kowacz.*

Réactif :

Paradiméthylaminobenzaldéhyde . . .	5 g
Alcool méthylique	75 cm3
HCl pur	25 cm3

Dissoudre l'aldéhyde dans l'alcool chauffé au bain-marie à 60°. Laisser refroidir. Ajouter l'acide d'abord goutte à goutte, puis plus rapidement. On obtient un liquide d'un beau jaune d'or. Si l'on ne prend pas la précaution de laisser refroidir la solution alcoolique avant l'addition de l'acide, on provoque un virage au brun qui nuit à la sensibilité de la réaction.

Les milieux utilisés, comme source de tryptophane, pour rechercher l'indole sont : l'eau peptonée (voir mannitol : groupe n° 1) et le milieu de Tittsler et Sandholzer (voir mobilité).

Réaction : ajouter quelques gouttes de ce réactif au milieu de culture. En cas de réaction positive, il se développe une belle coloration rouge.

Remarque. — Conserver le réactif à l'abri de la lumière en flacon jaune bouché au caoutchouc.

Réaction de Voges-Proskauer. — Utilisée pour déceler l'acétyl-méthyl-carbinol.

Cette réaction remonte à 1898; on l'utilisait à cette époque pour différencier les bacilles d'origine fécale des bacilles isolés des végétaux, considérés comme simples saprophytes. A cette époque, l'acétyl-méthyl-carbinol n'était pas encore découvert. Le déterminisme de cette réaction fut expliqué après l'étude de Grimbert qui, en 1901, caractérisa l'acétyl-méthyl-carbinol dans les cultures de *B. tartricus*. L'auteur mettait le nouveau produit en évidence par l'osazone (procédé encore employé par Lemoigne).

Dans la réaction de Voges-Proskauer, l'acétyl-méthyl-carbinol $CH_3.CO.CHOH.CH_3$ réagit en présence de la potasse avec les substances contenues dans la peptone du milieu, probablement un résidu de la guanidine pour donner un composé rose caractérisant un test positif.

Walpole a montré, en 1910, que l'aérobiose favorise nettement la production d'acétyl-méthyl-carbinol. D'après les études de Baritt, *Escherichia coli* pourrait fabriquer des traces d'acétyl-méthyl-carbinol, mais la réaction de Voges-Proskauer ne permet pas de les déceler.

Le milieu de culture utilisé est le milieu de Clark et Lubs que nous préférons :

Peptone	5 g
Glucose	5 g
Phosphate dipotassique	5 g
Eau	1.000 cm3

Chauffer, stériliser quinze minutes à 110°.

Pratiquer une culture de quarante-huit heures à l'étuve à 37° en milieu de Clark et Lubs. Ajouter volume égal de potasse à 10 p. 100. Remettre à l'étuve à 37°. L'apparition d'une coloration rose en cinq à six heures indique un test positif.

Rouge de méthyle. — Ce test fut proposé par Clark et Lubs, en 1915. Le *p*H limite joue un rôle primordial dans ce test. Le milieu de culture est une eau peptonée glucosée phosphatée.

Le colibacille attaque très rapidement le glucose et ne donne presque exclusivement que de l'acide lactique comme produit de dégradation; le *p*H limite de 5 est atteint et la culture est stoppée.

Aerobacter, par contre, attaque le glucose mais l'acide lactique ne constitue qu'une faible partie des produits de dégradation et le *p*H limite n'est pas atteint. Une fois le glucose dégradé, *l'Aerobacter* attaquera les peptones et il y aura libération d'ammoniaque; le *p*H remonte à 8 environ.

Technique : culture en milieu de Clark et Lubs pendant quarante-huit heures à 37°. Ajouter quelques gouttes d'une solution de rouge de méthyle à 1 p. 100 dans l'alcool.

Coloration rouge = test positif.
Coloration jaune = test négatif.

Citrate de soude. — Brown, en 1921, fut le premier à montrer l'intérêt du citrate de soude dans la différenciation de *Escherichia coli* et de *Aerobacter aerogenes.*

Koser en 1923, proposa un milieu synthétique où le citrate de soude constituait la seule source de carbone mise à la disposition de la bactérie. Koser avait montré que *Escherichia coli* était incapable d'utiliser l'acide citrique comme source de carbone, tandis que l'*Aerobacter aerogenes* donnait en sa présence des cultures luxuriantes. Ce phénomène fut par la suite étendu à la culture des Salmonelles. Simmons montra ainsi, en 1926, que le bacille de Shottmuller, *S. enteritidis* et *S. typhi murium* peuvent

utiliser le citrate de soude, tandis que *S. typhi* et *S. paratyphi A* n'utilisent pas ce sel.

Le milieu de Koser fut repris et perfectionné par Simmons qui le solidifia par adjonction de gélose et rendait la réaction plus nette en additionnant la solution de bleu de bromothymol. Jean Brisou insiste sur la nécessité de conserver la formule de Koser-Simmons pour l'étude de ce test.

L'adjonction de peptone proposée par Kauffmann ne présente plus le même intérêt. Dans un milieu contenant des peptones, il est évident que le citrate de soude ne constitue plus la seule source de carbone.

Des études faites sur ce sujet, on peut conclure qu'*Escherichia coli* est incapable de cultiver sur milieu au citrate de soude; *Aerobacter* et la plupart des *Klebsiella* donnent des cultures importantes qui font virer la teinte au bleu roi. En 1938, Leland, Parr et Simpson ont attiré l'attention sur des formes dites « mutantes », atypiques, dont le comportement sur le citrate de soude est douteux. On voit apparaître des colonies vers le cinquième jour de culture seulement; ces colonies provoquent lentement le virage du milieu au bleu. Les coliformes de type intermédiaire poussent également en plusieurs jours sur le milieu au citrate de soude et provoquent le virage plus ou moins rapide de la totalité du milieu.

S'inspirant du milieu de Koser, Simmons a préconisé la formule suivante :

Agar	20 g
ClNa	5 g
SO_4Mg	0,2 g
$PO_4H_2NH_4$	1 g
PO_4HK_2	1 g
Citrate de soude (2,5 H_2O)	2 g
Eau	1.000 cm³
Bromothymol (sol. alcool. 1,5 p. 100).	10 cm³

Filtrer, ajuster au *p*H = 7,1, répartir en tubes. Stériliser quinze minutes à 115°. Incliner.

Les tubes ensemencés doivent rester au moins quatre jours à l'étuve à 37°. La positivité se traduit par une culture visible et une coloration bleue intense que l'on obtient avec : *B. aerogenes*, *B. paratyphosus B*, *S. enteritidis*, *S. cholerae suis*, *S. typhi murium*.

On peut observer une faible coloration à la suite d'une incubation prolongée; ce résultat doit être considéré comme négatif.

Bacilles Gram négatif mobiles, lactose négatif.

Ensemencer sur les milieux suivants permettant d'établir un diagnostic de présomption :

— Milieu de Hajna.
— Milieu de Kendall et Ryan.
— Milieu de Tittsler et Sandholzer.
— Milieu de Simmons.
— Sérum coagulé.

Milieu de Hajna. — Ce milieu permet d'obtenir, dans un seul tube, trois indications :

— Fermentation ou non du glucose.
— Fermentation ou non du lactose.
— Production ou non de H_2S.

Préparation du milieu :

Eau distillée	1.000	cm3
Gélose	13	g
Peptone	20	g
ClNa	5	g

Ajuster au *p*H 7,4, puis ajouter :

Lactose	10	g
Glucose	1	g
Thiosulfate de soude	0,2	g
Sulfate de fer ammoniacal	0,2	g
Rouge de phénol (solution aqueuse 1 p. 100)	2,5	cm3

Le *p*H final est de 7,4.

Répartir le milieu à raison de 12 cm3 par tube, stériliser à l'autoclave à 115° pendant vingt minutes. A la sortie de l'autoclave, incliner les tubes de manière à laisser un culot assez important : 2 à 3 cm3 de hauteur. Il faut incliner uniquement les tubes que l'on veut utiliser. Les autres, capuchonnés, seront laissés dans un endroit sombre; ils ne seront liquéfiés au bain-marie et inclinés qu'au moment de l'emploi.

Le milieu a une belle coloration rouge cerise. Au sortir de l'autoclave, les tubes ont une coloration jaune, mais par refroidissement, ils reprennent la coloration rouge.

A partir de la colonie suspecte provenant du milieu d'isolement, ensemencer le culot par piqûre centrale et la surface par étalement. Les tubes, non recapuchonnés, sont portés à l'étuve à 37°.

a) Le glucose sera ou non fermenté, avec ou sans gaz. Le culot vire alors au jaune. Il existe en effet une zone d'anaérobiose dans le culot, et les bacilles, pour obtenir l'oxygène qui leur est nécessaire, dégradent le glucose avec production d'acide.

b) Le lactose, sur la surface inclinée (le bacille étant en aérobiose), fermente ou non avec virage du milieu. Sa fermentation fait virer la surface inclinée au jaune.

c) La production de H_2S se traduit par un noircissement du milieu dans la zone comprise entre le culot et la pente.

Cette coloration est beaucoup plus diffuse dans le culot pour *S. paratyphi B* et *Proteus*. Il faut noter que pour le B. typhique le noircissement est un peu tardif.

La lecture est faite après vingt-quatre heures.

Ce milieu permet une identification rapide de *Faecalis alcaligenes*, des *Proteus* et des Salmonelles. Nous verrons un peu plus loin qu'il nous sera également d'un grand secours pour l'identification des *Shigella*.

Milieu de Kendall et Ryan. — Ce milieu est un peu analogue au milieu de Hajna. C'est une gélose mannitée au 1/1.000 et saccharosée au 1/100. L'indicateur du virage est le rouge de phénol.

Eau distillée	1.000 cm3
Gélose	13 g
Peptone	20 g
ClNa	5 g

Ajuster au *p*H 7,4, puis ajouter :

Saccharose (solution à 30 p. 100)	30 cm3
Mannite (solution à 20 p. 100)	5 cm3
Rouge de phénol (solution utilisée pour la gélose au vert brillant)	10 cm3

L'ensemencement se fait par piqûre centrale du culot et étalement de la pente.

Une pente rouge et un culot jaune, avec ou sans gaz, indiquent la fermentation de la mannite. Un culot et une

pente jaunes indiquent la fermentation du saccharose ou de deux sucres. Un culot et une pente rouges indiquent qu'aucun des deux sucres n'a été fermenté.

Milieu de Tittsler et Sandholzer. — Ce milieu permettra de voir s'il y a production ou non d'indole. A l'aide de ce milieu nous vérifions la mobilité que nous avons établie par un examen entre lame et lamelle, et qui nous a servi à classer notre germe.

Etude du milieu (voir mobilité).

Milieu de Koser-Simmons. — Il nous permet de différencier certaines Salmonelles. Simmons a montré en effet, que certains germes tels que le bacille d'Eberth, le paratyphique A, n'utilisent pas le citrate de soude comme source de carbone et ne poussent pas sur ce milieu. Au contraire le paratyphique B et ses voisins y poussent très rapidement. Ce milieu nous confirmera donc un diagnostic.

Etude du milieu (voir « Test d'I.M.V.IC. »).

Sérum coagulé. — Ce milieu nous servira à diagnostiquer le *Pseudomonas aeruginosa.* Ce bacille liquéfie le sérum coagulé, et le milieu prend une teinte bleu-verdâtre. Ce milieu est également liquéfié par le *Proteus,* mais il n'apparaît pas de coloration.

Etude des milieux, des réactions biochimiques et sérologiques permettant un diagnostic de confirmation.

Escherichia coli et Freundi.

H_2S (voir groupe n° 2).

Aerobacter aerogenes et cloacae.

Gélatine (voir staphylocoque, groupe n° 1).
Glycérine.

Faecalis alcaligenes.

Petit lait (milieu de PETRUSCHKY) :

Prélever 100 g de lait dans la quantité que l'on veut traiter. Porter à l'ébullition et l'y maintenir. Ajouter peu à peu une solution d'acide chlorhydrique au dixième, contenue dans une pipette graduée. Agiter constamment. S'arrêter quand la coagulation apparaît. Lire la quantité d'acide utilisée.

Calculer la quantité nécessaire pour la coagulation de la quantité restante. L'ajouter goutte à goutte en maintenant le lait à l'ébullition. Veiller à ne pas ajouter un excès d'acide.

Après coagulation, laisser décanter à la glacière pendant quelques heures. Puis décanter et filtrer à plusieurs reprises de façon à obtenir un liquide à peu près clair.

Neutraliser, ajouter la teinture de tournesol. Répartir en tubes et stériliser par chauffage discontinu à 100°.

Proteus.

Sérum coagulé : liquéfié.

Préparation du milieu (voir corynebactéries, groupe n° 7).

Eau peptonée. — Pour rechercher l'indole (voir Test d'I.M.V.IC.).

Milieu de Fergusson. — Mise en évidence du pouvoir uréolytique.

La composition du milieu est la suivante :

Eau distillée	100	cm³
Urée	2	g
PO_4H_2K	0,1	g
PO_4HK_2	0,1	g
ClNa	0,5	g
Alcool absolu	1	g

Ajouter une solution de rouge de phénol à 0,2 p. 100 en quantité suffisante pour avoir une coloration nette.

Stériliser par filtration sur bougie L3, en créant une aspiration par le vide. Conserver les tubes à la glacière.

Répartir à raison de 0,1 cm³ par tube et ensemencer largement. Placer les tubes ensemencés à l'étuve à 37° en examinant de cinq minutes en cinq minutes pendant un quart d'heure.

Le bacille *Proteus* fait virer la coloration au violet.

Un tube ensemencé (contenant 5 à 6 cm³ de milieu de FERGUSSON) et placé à l'étuve vire au violet au bout de huit à dix heures s'il s'agit d'un *Proteus.*

Salmonellae.

Séro-agglutination. — Les Salmonelles actuellement connues sont très nombreuses. La différenciation des types repose sur l'étude de leurs caractères biochimiques, et essentiellement sur la caractérisation de leur équipement antigénique, à l'aide de sérums agglutinants expérimentaux.

Pour les *Salmonellae* les plus courantes rencontrées en pratique (*S. typhi, S. paratyphi A, S. paratyphi B, S. paratyphi C*), on utilisera quatre sérums O H :

Sérum agglutinant *S. typhi.*
Sérum agglutinant *S. paratyphi A.*
Sérum agglutinant *S. paratyphi B.*
Sérum agglutinant *S. paratyphi C.*

L'agglutination se fera macroscopiquement. Sur une lame de verre dégraissée, on dépose I goutte de sérum expérimental, dont le choix a été déterminé par le résultat de l'analyse biochimique. A côté de cette goutte de sérum on dépose I goutte d'eau physiologique. Avec l'ose de platine, on prélève une certaine quantité de culture sur la pente du tube de Hajna que l'on délaie dans la goutte d'eau physiologique de façon à obtenir une suspension opalescente. Mélanger soigneusement cette goutte avec la goutte de sérum. Imprimer un mouvement circulaire. Faire un témoin avec une suspension de culture dans de l'eau physiologique sans ajouter de sérum.

1° L'agglutination est immédiate. Elle se traduit par la formation de gros amas; entre les agglutinats, le liquide est complètement clair. Il s'agit d'une agglutination H. Le germe sera alors complètement identifié.

2° L'agglutination est tardive, en plus de cinq minutes. Les agglutinats sont fins, granuleux. Il s'agit d'une agglutination O. Le germe à identifier contient les composants somatiques correspondants aux agglutinines du sérum

expérimental. L'identification complète demande d'autres agglutinations avec des sérums H spécifiques d'autres espèces.

Soit, par exemple, un germe fermentant le glucose avec gaz, ne fermentant pas le lactose et donnant H_2S. Il s'agit soit de *S. paratyphi B*, soit de *S. typhi murium*, soit de *S. enteritidis*, pour s'en tenir aux *Salmonellae* les plus courantes; la possibilité d'un *Proteus* ayant été éliminée par la lecture des tubes de KENDALL et RYAN la recherche de l'indole et la réaction de FERGUSSON.

La mise en présence d'une suspension avec un sérum anti-paratyphique B donnera les résultats suivants :

— L'agglutination est immédiate; le germe isolé est *S. paratyphi B* type SCHOTTMULLER.

— L'agglutination est tardive, granulaire; le germe à identifier possède un antigène somatique identique à un des composants O de *S. paratyphi B*, mais son antigène est différent de l'antigène H de cette espèce. Il s'agit vraisemblablement de *S. typhi murium B* d'AERTRYCKE, qui donnera une agglutination H avec un sérum expérimental contenant l'agglutinine « i ».

— Aucune agglutination n'est constatée. Il est vraisemblable qu'il s'agit de *S. enteritidis* (*B* de GARTNER).

Dans ce cas, l'agglutination avec le sérum antibacille typhique montrera une agglutination granulaire tardive O, car *S. enteritidis* et *S. typhi* possèdent un antigène somatique commun (antigène IX). L'agglutination flagellaire ne sera obtenue qu'avec un sérum expérimental contenant l'agglutinine « g, m », spécifique de *S. enteritidis*.

(Cet exemple schématique est valable pour les *Salmonella* les plus fréquemment rencontrées en pratique courante.)

Dans le cas de *Salmonella* ne pouvant être identifiée par ce procédé, il faut envoyer la souche à un laboratoire spécialisé, avec l'observation du malade et les renseignements sur les conditions de l'isolement.

Les sérums agglutinants que nous avons utilisés ont été préparés à l'Institut Pasteur.

Pseudomonas aeruginosa.

Ce germe sécrète deux pigments dont un, la *pyocyanine*, de coloration bleue, est soluble dans le chloroforme, alors que l'autre ne l'est pas.

La pyocyanine peut facilement être mise en évidence dans les cultures en bouillon :

a) L'agitation du tube fait apparaître la teinte bleuâtre caractéristique.

b) En additionnant au milieu liquide quelques gouttes d'ammoniaque et 1 à 2 cm^3 de chloroforme. Après agitation, le chloroforme se dépose au fond du tube et contient la pyocyanine qu'il a dissoute; il a alors une belle coloration bleue. Après décantation, le chloroforme est additionné d'eau acidulée, qui redissout la pyocyanine et prend une coloration rose.

Gélatine : liquéfiée (voir préparation du milieu, groupe n° 1).

GROUPE N° 5

ÉTUDE DES GERMES
EN FORME DE BACILLES GRAM NÉGATIF IMMOBILES

L'ensemencement se fera systématiquement sur tous les milieux se trouvant à la gauche de notre tableau :

— Bouillon ordinaire;
— Gélose ordinaire;
— Milieu de Tittsler et Sandholzer;
— Gélose au sang;
— Gélose lactosée tournesolée;
— Gélose glycérinée fuschinée à 5 p. 100;
— Gélose glycérinée en atmosphère de CO_2.

Rechercher systématiquement la production de H_2S.

Etude des milieux permettant d'établir un diagnostic de présomption.

Bouillon ordinaire :
(Voir groupe n° 1.)

Gélose ordinaire :
(Voir groupe n° 1.)

Milieu de Tittsler et Sandholzer :
(Voir « Test d'I.M.V.IC. ».)

Ce milieu est utilisé pour vérifier l'immobilité des germes, immobilité qui a été établie par l'examen microscopique entre lame et lamelle,

Gélose au sang :

(Voir milieux de présomption du groupe n° 1.)

Moraxella lacunata ne pousse que sur ce milieu.

Gélose lactosée tournesolée :

(Voir groupe n° 1, étude des milieux sucrés.)

Gélose glycérinée à 5 p. 100 en atmosphère de CO_2 :

Milieu permettant la culture des *Brucellae*. La culture est beaucoup plus rapide que sur les autres milieux.

Gélose glycérinée à 5 p. 100 fuschinée :

Milieu permettant le développement de *Malleomyces mallei*.

Production de H_2S. — Se pratique comme il est indiqué au groupe n° 2.

Un test positif permettra d'établir un diagnostic de présomption en faveur des *Brucellae*.

ETUDE DES MILIEUX, DES TESTS BIOCHIMIQUES, DU POUVOIR PATHOGÈNE PERMETTANT D'ÉTABLIR UN DIAGNOSTIC DE PRÉSOMPTION.

Moraxella lacunata.

Ne pousse que sur milieu au sang.

Malleomyces mallei.

Gélose glycérinée à 5 p. 100 fuschinée. — Permet la culture du germe.

Mise en évidence des granulations métachromatiques :

Technique :

Diluer une parcelle de culture dans 1 goutte d'eau; sécher, fixer. Recouvrir le frottis avec une solution de bleu acétique. Chauffer jusqu'à dégagement de vapeurs. Laisser en contact cinq minutes. Laver rapidement à l'eau distillée.

Recouvrir avec une solution de vésuvine. Laisser agir quelques secondes pour ne pas surcolorer. A défaut de vésuvine, on peut

utiliser de la même façon une solution de lugol. Laver à l'eau distillée. Sécher.

Les corps bacillaires sont jaune verdâtre; les granulations polaires sont violet foncé.

Réactifs :

Bleu acétique :

Bleu de méthylène	0,5	g
Alcool absolu	2	cm^3
Acide acétique glacial	5	cm^3
Eau distillée	95	cm^3

Vésuvine :

Solution aqueuse obtenue par ébullition de 1 g de colorant dans 100 cm^3 d'eau.

Pouvoir pathogène. — Inoculation au *Cobaye mâle.*

Après inoculation intrapéritonéale, il se produit en deux ou trois jours un gonflement considérable du scrotum, avec présence de tubercules à l'intérieur du testicule. C'est l'orchite morveuse = signe de Strauss. La mort survient au bout de quinze jours au plus tard.

Klebsiella pneumoniae, Klebsiella ozenae.

Mannitol (voir milieux sucrés, groupe n° 1).

Maltose :

Ces deux sucres sont fermentés par *Klebsiella ozenae.* Ils ne le sont pas par *Klebsiella pneumoniae.*

Test d'I.M.V.IC. (voir groupe n° 4).

Gélose au sang. — Ces deux germes sont capsulés après culture sur ce milieu.

Coloration de la capsule (voir *Diplococcus pneumoniae,* groupe n° 1).

Shigellae.

Milieu de Hajna :
Milieu de Kendall et Ryan :
Milieu de Tittsler et Sandholzer :
(Voir groupe n° 4).

Remarque. — *Shigella dispar* et *Shigella sonnei* fermentent le lactose lentement en plus de quarante-huit heures.

Brucella melitensis, bovis, suis.

Les *Brucellae* sont des bacilles courts revêtant parfois l'aspect cocciforme.

Ils sont caractérisés par des mouvements browniens très nets. Ils ne font fermenter aucun sucre.

Les *épreuves de Huddleson* basées sur la production de H_2S, et sur la bactériostase exercée par certains colorants ajoutés au milieu de culture, permettent la différenciation des trois types de *Brucellae*.

Le milieu utilisé est la *gélose au foie de bœuf :*

ClNa	5 g
Peptone	10 g
Gélose	20 g
Eau	500 cm³
Macération de pulpe de foie de bœuf	500 cm³

La macération se fait avec 500 g de pulpe et 500 cm³ d'eau. Porter à l'ébullition pendant une heure en remuant fréquemment. Puis, porter à l'autoclave à une température de 120°. Filtrer. Stériliser. Le filtrat constitue la macération de foie.

Aux 500 cm³ d'eau, ajouter la peptone, le ClNa et la gélose. Faire fondre la gélose. Mélanger à parties égales cette solution et la macération de foie de bœuf. Ajuster à *p*H = 7.

Maintenir à une température de 55-60°, et ajouter du blanc d'œuf pour collage. Filtrer sur du coton de verre préalablement lavé avec une solution légèrement acidulée. Ajuster le filtrat à *p*H = 6,6. Mettre en tubes et stériliser.

a) *Mise en évidence de H_2S :* papier-réactif.

b) *Action bactériostatique des colorants :*

Préparer des solutions aqueuses à 0,5 p. 100 de thionine et de fuschine basique.

Faire fondre la gélose au foie de bœuf et, tant qu'elle est encore chaude, y ajouter des solutions mères de colorant de telle façon que la thionine soit diluée au 1/30.000 et que la fuschine basique soit diluée au 1/25.000.

Répartir en boîtes de Pétri que l'on fait sécher à l'étuve.

GROUPE N° 6

ÉTUDE DES GERMES EN FORME DE BACILLES GRAM POSITIF MOBILES

L'ensemencement se fera systématiquement sur tous les milieux se trouvant à la gauche de notre tableau :

— Bouillon ordinaire;
— Gélose ordinaire;
— Milieu de TITTSLER et SANDHOLZER.

Il sera systématiquement pratiqué une coloration de MOELLER.

ETUDE DES MILIEUX ET DES TECHNIQUES DE COLORATION PERMETTANT D'ÉTABLIR UN DIAGNOSTIC DE PRÉSOMPTION.

Bouillon ordinaire :

(Voir groupe n° 1.)

Gélose ordinaire :

(Voir groupe n° 1.)

Milieu de Tittsler et Sandholzer :

(Voir groupe n° 4.)

Ce milieu vérifie la mobilité établie entre lame et lamelle.

Coloration de Moeller :

Cette technique permet de colorer les spores.

Fixer deux minutes par l'alcool absolu et deux minutes par le chloroforme. Sans laver faire agir l'acide chromique à 5 p. 100 pendant trois à cinq minutes. Colorer à chaud par de la fuschine de Ziehl à plusieurs reprises pendant cinq à six minutes. Décolorer par SO_4H_2 à 5 p. 100 pendant quelques secondes, puis par l'alcool absolu.

Laver à l'eau. Recolorer avec une solution aqueuse de bleu de méthylène à 1 p. 100 pendant trente secondes.

Laver à l'eau et sécher.

Examiner à l'immersion : les germes sont colorés en bleu, les spores sont colorées en rose.

Diagnostic de confirmation.

Listeria monocytogenes.

Séro-agglutination par sérum homologue.

GROUPE N° 7

ÉTUDE DES GERMES EN FORME DE BACILLES GRAM POSITIF IMMOBILES (ZIEHL NÉGATIF)

L'ensemencement se fera systématiquement sur tous les milieux se trouvant à la gauche de notre tableau :

— Bouillon ordinaire;
— Gélose ordinaire;
— Milieu de Tittsler et Sandholzer;
— Sérum coagulé;
— Gélose lactosée tournesolée.

Il sera systématiquement pratiqué une recherche de spores par coloration de MOELLER.

ETUDE DES MILIEUX DE CULTURE PERMETTANT D'ÉTABLIR UN DIAGNOSTIC DE PRÉSOMPTION.

Bouillon ordinaire :

(Voir groupe n° 1.)

Gélose ordinaire :

(Voir groupe n° 1.)

Milieu de Tittsler et Sandholzer :

(Voir groupe n° 4, coliformes.)

Ce milieu permet de vérifier l'immobilité établie par un examen microscopique pratiqué entre lame et lamelle.

Sérum coagulé :

Ce milieu permet la culture des Corynébactéries.

Preparation. — Répartir le sérum en tubes stérilisés, les incliner dans l'étuve à coaguler. Opérer lentement la coagulation, sans dépasser 70-75°. Laisser refroidir. Tyndalliser de la sorte trois jours de suite.

Le milieu doit être à peine opalescent et suffisamment translucide pour permettre l'observation par transparence de très fines colonies.

Gélose lactosée tournesolée :

(Voir groupe n° 4.)

ETUDE DES MILIEUX ET DES TESTS
PERMETTANT D'ÉTABLIR UN DIAGNOSTIC DE CONFIRMATION.

Bacillus anthracis.

Liquéfie la gélatine.

Corynebacterium.

Caractères morphologiques des germes (massue, baguette de tambour).

Disposition des germes sur le frottis.

Caractères tinctoriaux :

— Décoloration par l'alcool;

— Mise en évidence des corpuscules métachromatiques par la coloration d'Ernst NEISSER.

GROUPE N° 8

BACILLES ACIDO-ALCOOLO-RÉSISTANTS (ZIEHL POSITIF)

A côté du *Mycobacterium tuberculosis* et du *Mycobacterium leprae*, qui sont très pathogènes, nous trouvons dans ce groupe le bacille du Smegma et le « bacille des robinets » qui ne sont pas pathogènes.

Mycobacterium leprae.

Ce germe reste incultivable. Il n'est pas inoculable aux animaux de laboratoire. Présence constante de globies.

Mycobacterium tuberculosis.

Culture. — Ce germe est cultivable sur un certain nombre de milieux. Nous avons utilisé deux milieux préparés à l'Institut Pasteur :

— Le milieu de Lowenstein;

— Le milieu de Dubos (permettant une croissance rapide).

Suivant le caractère des colonies sur le milieu de Lowenstein, on peut quelquefois différencier le bacille en trois types (humain, bovin, aviaire). Toutefois, les caractères morphologiques des colonies sont trompeurs et le seul critère de différenciation est l'inoculation au lapin.

Pouvoir pathogène. — Inoculation au cobaye.

L'inoculation se pratique toujours par voie sous-cutanée

et dans la région supérieure du membre postérieur droit.

Remarque. — Nous préférons injecter dans la cuisse gauche 1 cm^3 de sulfamide (0,20 g) que de détruire la flore microbienne associée par de l'acide sulfurique à 15 p. 100. En effet, cet acide peut détruire un pourcentage élevé de B. K. et le résultat de l'inoculation peut être négatif.

DÉTERMINATION DE LA SENSIBILITÉ DES GERMES AUX ANTIBIOTIQUES

A l'heure actuelle, l'identification des germes aérobies de contamination courante doit être suivie de la détermination de la sensibilité des germes aux antibiotiques.

Le principe de la détermination de la sensibilité d'un germe aux antibiotiques est simple et bien connu. Il consiste à noter le taux nécessaire du principe actif pour inhiber toute culture en utilisant la technique des dilutions; ou bien à évaluer le diamètre d'inhibition de la culture autour des sources d'antibiotiques dans les techniques de diffusion en gélose.

Sur le plan théorique, quelle que soit la technique utilisée, un certain nombre de points sont à considérer :

1° Choix de l'état physiologique du germe.

2° Nombre de germes servant à l'ensemencement.

3° Choix du milieu.

I. — CHOIX DU GERME.

Il faut que le germe soit, d'une part, dans les meilleures conditions physiologiques et qu'il se trouve, d'autre part, à un stade de développement tel qu'il puisse être repris toujours dans les mêmes conditions de façon à pouvoir obtenir des résultats superposables lors de différentes déterminations de sensibilité. Pour ce choix, il faut tenir compte de trois facteurs :

A. — Lieu de prélèvement chez le malade.

La détermination des variations de résistance d'un germe chez un même malade, en opérant sur des germes prélevés en des points différents lors de chaque prise d'essai, serait une faute bactériologique grave conduisant à des résultats différents.

Il faut toujours opérer d'une façon semblable dans chaque cas particulier lorsqu'on veut étudier les variations de la sensibilité d'un germe au cours d'une même maladie.

B. — Stade d'évolution de la maladie au moment du prélèvement.

On considère actuellement que tout se passe comme si l'équipement enzymatique du bacille, sa sensibilité et sa résistance vis-à-vis d'un antibiotique étaient fonction de son degré d'évolution dans l'organisme qu'il parasite.

C. — Phase de la culture au moment de la détermination de la dose active d'antibiotique.

Il est logique d'étudier le comportement physiologique d'un germe dans sa phase de vitalité maxima, c'est-à-dire dans sa phase logarithmique de multiplication.

II. — NOMBRE DE GERMES SERVANT A L'ENSEMENCEMENT.

C'est la qualité d'inoculum, prise sur la culture primitive du germe et qui, réensemencée en milieu convenablement choisi en présence de quantité connue d'antibiotique, va déterminer le degré exact de la « résistance ».

La réponse est différente suivant que l'inoculum est grand ou petit. Il faut toujours opérer avec des quantités semblables lors d'études parallèles.

III. — CHOIX DU MILIEU.

Il faut choisir un milieu de culture tel que le germe ne soit ni lésé, ni transformé et qu'il garde intactes toutes ses propriétés initiales.

TECHNIQUE

Les techniques employées pour le titrage de la sensibilité d'un germe aux antibiotiques sont de deux ordres :

— Techniques de dilutions sériées;

— Techniques de diffusion en gélose.

Les premières, utilisées depuis longtemps pour les antiseptiques déterminent en milieu liquide la concentration minima par cm^3 à un antibiotique pour inhiber un germe. Ces techniques sont excellentes dans le cas particulier d'affections monomicrobiennes, mais elles ne permettent d'étudier qu'un seul antibiotique vis-à-vis d'un seul germe.

Nous préférons les méthodes de diffusion en gélose, mises au point par Flemming et Garrod. Les différents germes d'un produit pathologique déterminent autour des sources d'antibiotiques des cercles d'inhibition différents dont on mesure le diamètre.

Grâce à des courbes étudiées une fois pour toutes, le diamètre de ces cercles est traduit en taux inhibiteurs par cm^3, correspondant aux taux donnés par la méthode de dilution.

Il existe deux procédés pour pratiquer la méthode de diffusion en gélose préconisée par Chabbert et Surreau de l'Institut Pasteur :

— Méthode des cupules en gélose;

— Méthode des disques. (Nous avons utilisé cette méthode dans notre travail.)

1° *Méthode des cupules en gélose.* — Cette technique utilise des cupules creusées dans la gélose à l'aide d'un

emporte-pièce en métal ayant 10 mm de diamètre. Chaque cupule est remplie d'une dilution d'antibiotique en quantité bien déterminée.

Mais cette méthode doit être pratiquée avec beaucoup de minutie pour éliminer toute cause de souillure. Nous avons préféré utiliser la méthode des disques, basée sur le même principe, donnant des résultats comparables, mais d'une mise en train plus simple et plus rapide.

2° *Méthode des disques de l'Institut Pasteur.* — On fait usage de disques de 10 mm de diamètre découpés à l'emporte-pièce dans des papiers de couleurs différentes. A chaque couleur correspond un antibiotique. Ces disques sont imbibés de solution à 1.000 µg d'antibiotique au cm³. Le pouvoir d'absorption de ces disques est tel que chacun d'eux est chargé de 40 µg de substance active.

On dispose ces disques sur la gélose ensemencée d'une boîte de Pétri. La diffusion détermine dans la gélose des concentrations décroissantes d'antibiotiques, et après la culture chaque disque est entouré d'une zone circulaire où le germe n'a pas poussé. Le diamètre de cette zone d'inhibition permet d'apprécier la sensibilité du germe.

Technique :

1° Couler dans une boîte de Pétri de 10 cm de diamètre, 30 cm³ de milieu gélosé :

— Gélose ordinaire, qui est le plus couramment utilisée;
— Gélose au sang si le germe ne pousse qu'en milieu enrichi;
— Gélose ascite.

2° Préparer une dilution de la culture à examiner. Partir d'une culture en bouillon de vingt-quatre heures. La dilution sera d'autant plus poussée que le germe pousse plus facilement. (Pour des germes qui se multiplient très rapidement comme le staphylocoque ou le colibacille, poter une ose de culture dans 10 cm³ d'eau distillée stérile.)

3° Porter I goutte de cette dilution au centre de la boîte et l'étaler sur toute la surface avec une pipette coudée.

4° Poser sur la gélose un disque de chaque antibiotique, tous régulièrement disposés à 1 cm de la périphérie.

Pénicilline	disque vert
Streptomycine	disque blanc
Chloromycétine	disque bleu
Auréomycine	disque jaune
Terramycine	disque rose

5° Porter la boîte renversée à l'étuve à 37° pendant dix-huit à vingt-quatre heures.

6° Mesurer en millimètres le *diamètre* (et non le rayon) des zones d'inhibition données par chaque antibiotique vis-à-vis de chaque germe.

Interprétation de la lecture

a) *Qualitative :*

— Absence de zone d'inhibition = souche résistante.
— Présence de zone d'inhibition = souche sensible.

Il faut que le diamètre de cette zone soit supérieur à 20 mm, pour que la concentration inhibitrice pour la souche étudiée soit inférieure ou égale aux concentrations sanguines obtenues avec un traitement habituel.

b) *Semi-quantitative :* l'Institut Pasteur publie un tableau donnant les rapports entre les diamètres des zones d'inhibition (en millimètres) et l'ordre de grandeur des concentrations inhibitrices (en unités par cm^3).

Ce tableau classe les germes en quatre groupes :

— *Souches sensibles :* la concentration inhibitrice est inférieure aux concentrations sanguines obtenues avec un traitement habituel.

— *Souches limites :* la concentration inhibitrice est au voisinage des concentrations sanguines.

— *Souches échappant au traitement :* la concentration inhibitrice est supérieure aux concentrations sanguines habituelles.

Toutefois, ces souches pourront être atteintes dans certains cas :

— Par augmentation des doses par voie générale avec des antibiotiques peu toxiques comme la pénicilline.
— Au cours des affections urinaires.
— Dans des traitements locaux.

— *Souches résistantes :* souches qui ne peuvent être atteintes par des doses thérapeutiques.

c) *Quantitative :* dans notre travail, nous n'avons pratiqué que des lectures semi-quantitatives mais, pour plus de précision, on doit faire parallèlement, sur le même milieu, avec les mêmes disques et avec un inoculum très voisin, le titrage de la souche à étudier et celui de la souche test de staphylocoques de Londres (collection de l'Institut Pasteur).

Pour chaque antibiotique, on calcule en millimètres la différence entre la souche à titrer et la souche test. On reporte cette différence sur l'ordonnée d'un graphique. A l'aide de la courbe donnée pour cet antibiotique on lit sur l'abscisse, le taux de sensibilité de la souche à titrer exprimé soit en u. O. par cm^3 pour la pénicilline, soit en μg par cm^3 pour les autres antibiotiques.

Les tests de sensibilité des germes aux antibiotiques donnent au clinicien une indication thérapeutique.

Le parallélisme entre le test *in vitro* et le résultat *in vivo*, sans être absolument superposable, est néanmoins suffisant pour guider le traitement. Il faut se rappeler qu'un échec thérapeutique peut être expliqué par une localisation du germe dans un « repaire anatomique », ou par une élimination rénale trop rapide.

De plus, des tests répétés sur les mêmes germes permettent de juger de la diminution de leur sensibilité à l'agent mycothérapique.

CONCLUSIONS

Les échecs de la mycothérapie ont des causes aussi complexes que variées.

Dans la plupart des cas, la théorie mutationiste explique l'acquisition de la résistance. Elle rend compte des récidives ou du passage à la chronicité.

Cependant, un certain nombre d'échecs thérapeutiques ont pour cause une sélection et une substitution de germes sur un terrain prédisposé; ou encore l'apparition de manifestations fongiques.

Notre méthode de travail comporte :

— L'isolement des germes successifs;
— Leur identification;
— Leur sensibilité aux antibiotiques courants,

sans nous occuper cependant de l'étude microbiologique des manifestations fongiques.

BIBLIOGRAPHIE

1. Abbot, Fernando & Curling, *Brit. Med. Journ.*, 1952, **1**, 523.
2. Bordet, P., *C. R. Biologie*, 1948, **142**, 257.
3. Bordet, P. & Beumer, *Bull. Acad. Royale Méd. Belgique*, 1949, **14**, 116-134.
4. Bordet, P. & Beumer, *Revue Belge Path. et Méd. Expér.*, 1951, **21**, 245-250.
5. Brisou, J., *Presse Médicale*, 15 mars 1952.
6. Cavalli, Symposium sur le mécanisme d'action des antibiotiques. II[e] Congrès International de Biochimie, Paris, 1952, 78.
7. Chabbert, Y., *Presse Médicale*, 13 décembre 1952.
7[bis]. Couturier, Y., Thèse de Doctorat en Médecine, Bordeaux, 1952.
8. Demerec, *Journ. Bacteriology*, 1948, **56**, 63.
9. Ebel, Vendrely & Tulasne, *C. R. Soc. Biol.*, 1948, **142**, 239.
10. Ellard Yow, M. (Houston, Texas), *Journ. of Laboratory and Clinic Medical*, 1951, **38**, 963.
11. English & Mac Coy, *Journ. Bacteriology*, 1951, **62**, 19-26.
12. Gale & Taylor, *Nature*, 1946, 158.
13. Gale & Rodwell, *Journ. Gen. Microbiology*, 1949, **3**, 127-142.
14. Gale, *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, 1948, **83**, 119.
15. Gale, Symposium sur le mécanisme d'action des antibiotiques. II[e] Congrès International de Biochimie, Paris, 1952, p. 5.
16. Geiger, Umbreit & Tonhazy, *Journ. Bact.*, 1949, **58**, 769.
17. Grelet, *Ann. Inst. Pasteur*, 1949, **77**, 263.
18. Gros & Machebœuf, *Ann. Inst. Pasteur*, 1948, **74**, 368.
19. Gros, Machebœuf, Ryback & Lacaille, *Ann. Inst. Pasteur*, 1949, **77**, 246.
20. Harris, Aureomycine and Chloramphenicol in Brucellosis with special references to side effects. *Journ. Amer. Med. Assoc.*, 21 janvier 1950, 142.
21. Hirsh & Dosdogru, *Arch. Biochem*, 1947, **14**, 213.
22. Hotchkiss, R. D., *Adv. Enzymol.*, 1944, **4**, 153.
23. Hotchkiss, *Journ. Exp. Méd.*, 1950, **91**, 351.
24. Hunter & Baker, *Science*, 1949, **23**, 1104.
25. Klein, *Journ. Bacteriology*, 1947, **53**, 463.

26. Kramptiz & Werkmann, *Arch. Biochem.*, 1947, **12**, 57.
27. Kramptiz & Werkmann, *Arch. Biochem.*, 1947, **12**, 57.
28. Linz, *Revue Belge Path. et Méd. Expér.*, 1948, **77**, 246.
29. Linz, *Ann. Inst. Pasteur*, 1949, **76**, 250-262.
30. Loomis, W. F., *Science*, 1950, **111**, 474.
32. Maas & Johnson, *Journ. Bact.*, 1949, **58**, 361.
33. Machebœuf & Gros, *Journ. Méd. Bordeaux*, 1953, **2**, 369-370.
34. Machebœuf & Gros, *Journ. Méd. Bordeaux*, 1953, **2**, 375.
35. Machebœuf & Gros, *Bull. Acad. Méd.*, 1948, 80.
36. Machebœuf & Gros, *Ann. Inst. Pasteur*, 1949, **77**, 127.
37. Mitchell, *Nature*, 1949, **164**, 259.
38. Mitchell & Moyle, *Journ. Gen. Microbiol.*, 1951, **5**, 421.
40. Park & Johnson, *Journ. Biol. Chem.*, 1949, **179**, 585.
41. Pollock, Symposium sur la biogénèse des protéines. II[e] Congrès International de Biochimie, Paris, 1952, p. 67.
42. Rowley, Cooper, Smith & Roberts, *Biochem. Journ.*, 1950, **46**, 157.
43. Smith, Worrel & Swanson, *Journ. Bact.*, 1948, **58**, 803-809.
44. Smith & Worrel, *Arch. Biochem.*, 1950, **28**, 232-241.
45. Schuler, *Helv. Physiol. Pharm. Acta*, 1944, **2**, C, 21.
46. Tomaszenski, *Brit. Med. Journ.*, 24 février 1951, 388-392.
47. Truhaut, Lambin & Boyer, *Bull. Soc. Chimie Biol.*, 1951, **33**, 387-393.
48. Vendrely, Tulasne & Minck, *C. R. Soc. Biol.*, 1948, **142**, 239.
49. Werner, Thèse n° 1138, Fac. Sciences Genève, 1949.
50. Woods, D. D., *Brit. Journ. Exper. Path.*, 1940, **21**, 74.
51. Woods, Manning & Patterson, Monilial infections complicating the use of antibiotics. *Journ. Amer. Med. Assoc.*, 27 janvier 1951, 145.

TABLE DES MATIÈRES

Pages

Introduction 7

Chapitre premier. — Phénomènes d'acquisition de résistance des germes aux antibiotiques 11

I. — Mode d'action de la pénicilline 14

II. — Mode d'action de la streptomycine 19

III. — Mode d'action de la chloromycétine 19

IV. — Mode d'action de l'auréomycine 20

V. — Mode d'action des colicines 20

Acquisition de la résistance « in vivo » 22

I. — Mode d'apparition de la résistance 22

II. — Caractères de la résistance *in vitro* 28

Acquisition de la résistance « en clinique » 29

I. — Résistance acquise aux différents antibiotiques. 29

II. — Etude de l'évolution d'une espèce microbienne vers la résistance 31

Chapitre II. — Substitutions de germes et modifications de la flore microbienne sous l'influence des antibiotiques. 35

Flore des syndromes urinaires 38

Flore associée des affections pulmonaires 50

Flore du tractus intestinal 51

Affections fongiques 54

Méthode de travail.

Identification des germes aérobies de contamination courante et test de sensibilité des germes aux antibiotiques. 61

I. — Mobilité 63

II. — Morphologie 64

Pages

III. — Coloration de Gram 65
IV. — Coloration de Ziehl 66

Isolement des germes 67
I. — Isolement par épuisement à la surface des milieux solides 67
II. — Dilution et mise en culture en milieux solides préalablement liquéfiés. Méthode des dilutions 68

Groupe n° 1 71
Etude des germes en forme de cocci Gram positif 71

Groupe n° 2 80
Etude des cocci Gram négatif et formes affines 80

Groupe n° 3 83
Etude des coccobacilles Gram négatif en navette 83

Groupe n° 4 85
Etude des bacilles Gram négatif mobiles 85

Groupe n° 5 100
Etude des germes en forme de bacilles Gram négatif immobiles 100

Groupe n° 6 104
Etude des germes en forme de bacilles Gram positif mobiles 104

Groupe n° 7 106
Etude des germes en forme de bacilles Gram positif immobiles (Ziehl négatif) 106

Groupe n° 8 108
Bacilles acido-alcoolo-résistants (Ziehl positif) 108

Détermination de la sensibilité des germes aux antibiotiques 110
I. — Choix du germe 110
II. — Nombre de germes servant à l'ensemencement.. 111
III. — Choix du milieu 112

Conclusions 117

Bibliographie 119

Bordeaux. — Imp. E. Drouillard, place de la Victoire, 3.